



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Neuroscienze

Ciclo XXVIII

TITOLO TESI

**Il trattamento neonatale con estradiolo modifica
l'espressione e la funzione dei recettori GABA_A
e la sensibilità allo stress nel ratto adulto**

Settore scientifico-disciplinare di afferenza

BIO/14

Presentata da:

Dott. Andrea Locci

Coordinatore Dottorato:

Prof. Walter Fratta

Tutor:

Prof.ssa Alessandra Concas

Esame finale Anno Accademico 2014 - 2015

INDICE

PREMESSA	<i>pag. 1</i>
INTRODUZIONE	<i>pag. 2</i>
<i>Estrogeni e periodo perinatale</i>	<i>pag. 3</i>
<i>Steroidi neuroattivi</i>	<i>pag. 6</i>
CAPITOLO 1	<i>pag. 11</i>
<i>Effetto della somministrazione neonatale di estradiolo sulla struttura e funzione dei recettori GABA_A nell'ippocampo di ratto adulto</i>	<i>pag. 11</i>
<i>Steroidi neuroattivi e plasticità del recettore GABA_A</i>	<i>pag. 14</i>
<i>Obiettivo</i>	<i>pag. 16</i>
<i>Metodi</i>	<i>pag. 16</i>
<i>Animali</i>	<i>pag. 16</i>
<i>Trattamento neonatale con estradiolo benzoato</i>	<i>pag. 17</i>
<i>Monitoraggio del ciclo estrale</i>	<i>pag. 17</i>
<i>Estrazione e misurazione degli steroidi cerebrali e plasmatici mediante dosaggio radioimmunologico (RIA)</i>	<i>pag. 19</i>
<i>Preparazione delle membrane cellulari per Western blot</i>	<i>pag. 20</i>
<i>Western blot</i>	<i>pag. 20</i>
<i>Preparazione delle fettine cerebrali per elettrofisiologia</i>	<i>pag. 22</i>
<i>Esperimenti di whole-cell patch clamp</i>	<i>pag. 22</i>
<i>Analisi statistica</i>	<i>pag. 23</i>
Risultati e discussione	<i>pag. 24</i>
<i>Effetto del trattamento neonatale con estradiolo sui livelli degli steroidi neuroattivi nell'ippocampo di ratti femmina adulti</i>	<i>pag. 24</i>
<i>Effetto del trattamento neonatale con estradiolo sull'espressione e la funzione dei recettori GABA_A nella frazione extrasinaptica dell'ippocampo di ratti femmina adulti</i>	<i>pag. 26</i>
<i>Effetto del trattamento neonatale con estradiolo sull'espressione e la funzione dei recettori GABA_A nella frazione sinaptica dell'ippocampo di ratti femmina adulti</i>	<i>pag. 33</i>

CAPITOLO 2	<i>pag. 40</i>
<i>Effetto della somministrazione neonatale di estradiolo sulla sensibilità allo stress nel ratto adulto</i>	<i>pag. 40</i>
<i>Obiettivo</i>	<i>pag. 41</i>
<i>Metodi</i>	<i>pag. 42</i>
<i>Animali e trattamento neonatale con estradiolo benzoato</i>	<i>pag. 42</i>
<i>Foot-shock stress</i>	<i>pag. 42</i>
<i>Trattamento con desametasone</i>	<i>pag. 42</i>
<i>Trattamento con progesterone</i>	<i>pag. 42</i>
<i>Estrazione e misurazione degli steroidi cerebrali e plasmatici mediante dosaggio radioimmunologico (RIA)</i>	<i>pag. 43</i>
<i>Preparazione dei lisati cellulari e Western blot</i>	<i>pag. 43</i>
<i>Microdialisi cerebrale</i>	<i>pag. 44</i>
<i>Hot plate test</i>	<i>pag. 44</i>
<i>Analisi statistica</i>	<i>pag. 45</i>
<i>Risultati e discussione</i>	<i>pag. 45</i>
<i>Effetto del trattamento neonatale con estradiolo sulla sensibilità allo stress acuto e sull'espressione dei recettori GR e MR in ratti femmina adulti</i>	<i>pag. 45</i>
<i>Effetto del trattamento neonatale con estradiolo sulla sensibilità dei neuroni dopaminergici mesocorticali allo stress acuto in ratti femmina adulti</i>	<i>pag. 52</i>
CONCLUSIONI	<i>pag. 57</i>
BIBLIOGRAFIA	<i>pag. 58</i>

PREMESSA

Ho svolto i tre anni di dottorato di ricerca presso il Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Sezione di Neuroscienze e Antropologia dell'Università degli Studi di Cagliari.

In questa tesi presento i risultati ottenuti nel Laboratorio di Neurochimica diretto dalla Prof.ssa Alessandra Concas.

Il gruppo di ricerca guidato dalla Prof.ssa Alessandra Concas ha dimostrato che il trattamento neonatale con estradiolo induce, nei ratti femmina adulti, una drastica e persistente riduzione dei livelli cerebrocorticali, ipotalamici e plasmatici di progesterone e del suo metabolita neuroattivo allopregnanolone; inoltre tale trattamento modifica l'espressione di specifiche subunità del recettore GABA_A a livello cerebrocorticale e altera il comportamento sessuale e il comportamento agonistico in età adulta (Calza et al., 2010; Berretti et al., 2014).

Lo scopo del mio lavoro è stato quello di approfondire gli studi sugli effetti indotti dall'esposizione neonatale ad estrogeni in ratti femmina adulti. In particolare, sono stati esaminati gli effetti del trattamento neonatale con estradiolo sulle concentrazioni di allopregnanolone e sulle modificazioni dell'espressione e della funzione del recettore GABA_A nell'ippocampo di ratti femmina adulti in relazione alle concentrazioni plasmatiche dell'allopregnanolone (Capitolo 1). Poiché l'allopregnanolone svolge un ruolo importante nel regolare l'omeostasi in seguito allo stress acuto, sono stati inoltre valutati gli effetti del trattamento neonatale con estradiolo sulla sensibilità allo stress acuto nei ratti femmina adulti (Capitolo 2).

INTRODUZIONE

L'esposizione a estrogeni o a sostanze estrogeno-simili come gli interferenti endocrini è piuttosto frequente nella società moderna. Gli interferenti endocrini sono composti, naturali o di sintesi, che modificano le funzioni endocrine, spesso in modo permanente, causando effetti avversi per l'organismo e la sua progenie. Queste sostanze sono ampiamente utilizzate nell'industria chimica e farmaceutica e sono presenti in grosse quantità nell'ambiente come contaminanti. Pertanto, l'uomo e gli animali ne vengono a contatto attraverso l'aria, l'acqua e anche il cibo. Molti interferenti endocrini sono estrogeni, naturali o di sintesi, o composti estrogeno-simili chiamati anche xenoestrogeni. Tra questi ultimi troviamo il bisfenolo A (presente nella plastica, inclusa quella dei contenitori utilizzati per cibi e bevande), i policlorobifenili, alcuni insetticidi e certe resine metacrilate usate in ortodonzia. Ci sono poi fitoestrogeni naturali come la genisteina, presente in alcuni legumi come fave, lupini e soia, ed estrogeni sintetici come estradiolo benzoato, dietilstilbestrolo ed etinilestradiolo, quest'ultimo l'estrogeno più diffuso nelle pillole contraccettive e presente in elevate quantità nelle acque reflue. Tutte queste sostanze mimano, antagonizzano o alterano i livelli degli steroidi endogeni, agendo sul loro metabolismo o sui loro recettori. L'esposizione a interferenti endocrini è ormai ubiquitaria e inevitabile e si ritiene che essa sia responsabile di effetti avversi osservati con frequenze sempre più elevate come pubertà precoce, infertilità, obesità, diabete, tumori, disturbi cognitivi, alterazioni del tono dell'umore, alterazioni nell'interazione sociale e disturbi della personalità (Panzica et al., 2007; De Coster & van Larebeke, 2012; Frye et al., 2012). Gli interferenti endocrini alterano anche il differenziamento sessuale. Per esempio l'esposizione neonatale alla genisteina altera l'apertura vaginale, il ciclo estrale, caratterizzato da una fase di estro persistente e prolungata, e determina atrofia ovarica con perdita del corpo luteo (Kouki et al., 2003). Ancora, l'esposizione a bisfenolo A induce una drastica riduzione sia dei comportamenti sessuali procettivi che dell'espressione dei recettori per gli estrogeni $ER\alpha$ in specifici nuclei ipotalamici implicati nella manifestazione sia dei comportamenti procettivi che recettivi (Monje et al., 2009). Nel complesso, l'esposizione ad estrogeni o a molecole ad azione estrogenica durante il periodo dello sviluppo porta a tutta una serie di effetti in età adulta, che dipendono dalla dose e

dalla durata dell'esposizione, dal periodo di vita in cui avviene l'esposizione e dal sesso dell'individuo.

Estrogeni e periodo perinatale

Gli estrogeni, come gli altri ormoni sessuali a struttura steroidea, derivano dal colesterolo e vengono prodotti dall'ovaio, dal surrene e, per conversione di altri precursori steroidei, da altri tessuti periferici. Nell'ovaio, che è la sede principale di produzione di estrogeni, soltanto le cellule della granulosa del follicolo esprimono l'enzima aromatasi, implicato nella loro sintesi a partire dagli androgeni.

Gli estrogeni circolano nel sangue in forma libera, biologicamente attiva, oppure legati ad una proteina carrier chiamata SHBG (sex hormone binding globulin), vengono metabolizzati e resi idrosolubili a livello epatico, quindi escreti dal rene.

Tra i diversi tipi di estrogeni prodotti dall'organismo, i principali per quantità e attività biologica sono il 17 β -estradiolo, l'estrone e l'estriolo (Figura 1). Il 17 β -estradiolo è il più importante e viene prodotto durante l'età feconda; l'estrone è invece caratteristico della menopausa e deriva dalla metabolizzazione periferica dell'androstenedione; infine l'estriolo è sintetizzato in quantità elevata dalla placenta, durante la gravidanza.

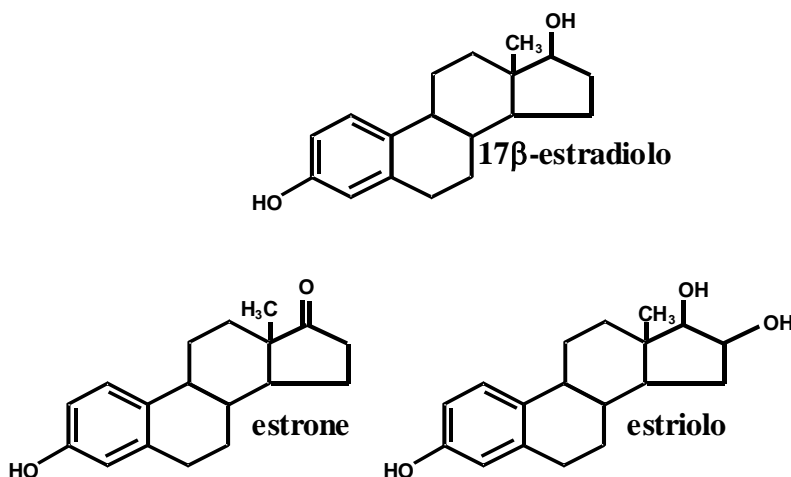


Figura 1. Struttura molecolare degli estrogeni.

Gli estrogeni sono responsabili della maturazione, dall'infanzia alla vita fertile, degli organi genitali femminili (ovaio, utero, vagina, tube) e dello sviluppo dei caratteri sessuali

secondari (mammelle e configurazione corporea in generale); inoltre, con le loro variazioni cicliche, garantiscono la fertilità nella donna (Meaney et al., 1983).

Le patologie da carenza o eccessiva secrezione di estrogeni sono da ricondurre a differenti cause, ed i loro sintomi dipendono dall'età in cui si manifestano; presentano particolare rilievo quando colpiscono la donna in età fertile, determinando amenorrea, sterilità, infertilità, fino alla perdita delle caratteristiche corporee femminili.

È inoltre noto che nel periodo perinatale, gli steroidi gonadici, ed in particolare gli estrogeni, sono fondamentali nella regolazione del dimorfismo sessuale (McCarthy & Nugent, 2015), nella plasticità neuronale e nella crescita e sviluppo del sistema nervoso centrale e dell'asse gonadico (Morris et al., 2004). Recenti studi sembrano indicare che l'estrogeno potrebbe agire su specifici enzimi, come le cicloossigenasi di tipo 2 (COX-2), modificando la sinaptogenesi in specifiche aree del cervello e quindi la formazione dei recettori sinaptici (Schwarz & McCarthy, 2008).

Il differenziamento sessuale è quel processo attraverso il quale un organismo sviluppa i caratteri sessuali e mostra un comportamento riproduttivo maschile o femminile in età adulta. I cromosomi sessuali rappresentano il punto d'origine delle differenze tra i due sessi per quanto riguarda la maggior parte delle specie animali. Nei mammiferi il maschio presenta un cromosoma X e uno Y mentre la femmina presenta due cromosomi X. La differenza genica più importante è rappresentata dal gene SRY, espresso soltanto nel cromosoma Y del maschio, il quale è implicato nel differenziamento dei testicoli a partire dalle gonadi a livello embrionale (Koopman et al., 1991). Tale gene codifica per un fattore di trascrizione denominato "fattore di determinazione del testicolo" il quale a sua volta è implicato nell'up-regulation di altri geni implicati in ultimo nel differenziamento e nello sviluppo dei testicoli (Kashimada & Koopman, 2010). In assenza del gene SRY, le gonadi si differenzieranno in ovaie. Nel maschio i testicoli produrranno il testosterone, che determina il differenziamento dei genitali interni ed esterni, e l'ormone inibente il dotto di Müller, che impedisce lo sviluppo e la differenziazione degli organi riproduttivi femminili. Anche il cervello va incontro ad una differenziazione sessuale controllata da meccanismi ormonali. Nei roditori il testosterone, rilasciato dai testicoli fetali, supera la barriera ematoencefalica, ed è convertito in estradiolo dall'enzima aromatasi (Mobbs et al., 1984). L'estradiolo, legandosi ai suoi recettori, è in grado di indurre la mascolinizzazione di specifiche aree cerebrali e dei circuiti neuronali implicati in età adulta in tutta una serie di comportamenti legati alla riproduzione, aggressività, territorialità e cura paterna della prole.

(McCarthy, 2008; Wu et al., 2009). Le differenze di genere a livello cerebrale si manifestano sotto diversi aspetti, tra cui differenze nel volume di specifiche aree cerebrali e nello spessore della corteccia cerebrale o differenze nella densità delle spine dendritiche e nell'arborizzazione dendritica dei neuroni, o ancora nella complessità degli astrociti (Gorski et al., 1978; Mong et al., 2001). Molte delle differenze cerebrali di genere riguardano aree fondamentali per il comportamento sessuale e per il pattern di secrezione delle gonadotropine in età adulta.

La prima evidenza sperimentale sul meccanismo ormonale responsabile del differenziamento sessuale del cervello cerebrale risale agli anni '50, quando è stato dimostrato che in femmine di porcellini d'India il trattamento prenatale con testosterone induce l'assenza di comportamento sessuale femminile in età adulta (Phoenix et al., 1959). Successivamente è stato dimostrato che anche il trattamento neonatale con estradiolo è in grado di indurre la mascolinizzazione sia cerebrale che comportamentale in ratti femmina (McEwen et al., 1977). Negli anni successivi è stato ampiamente dimostrato che la somministrazione a ratti femmina di basse dosi di testosterone entro la prima settimana dalla nascita, induce una marcata e duratura modificazione nella funzione dell'asse gonadico, simile a quella che si manifesta durante l'invecchiamento fisiologico. Infatti, ratti femmina trattati alla nascita sia con testosterone (testosterone propionato) che con estrogeno (estradiolo benzoato), mostrano la mancanza di un normale ciclo ovarico. Questo fenomeno, chiamato sindrome anovulatoria ritardata, è associato ad una disfunzione del sistema neuroendocrino che si manifesta con un'alterata regolazione del rilascio dell'ormone luteinizzante (LH) e della prolattina (Korenbrod et al., 1975), e con il deterioramento delle ovaie con conseguente alterazione della secrezione degli ormoni gonadici (Aguilar et al., 1983; Handa & Gorski, 1985; Rodriguez et al., 1993). Questi effetti, la cui comparsa dipende dalla dose e dalla durata dell'esposizione a questi ormoni gonadici, permangono per tutta la vita dell'animale (Aguilar et al., 1984). Numerosi altri lavori hanno dimostrato il processo di differenziamento cerebrale indotto dall'estradiolo mediante l'utilizzo di differenti protocolli sperimentali. Ad esempio, sia la somministrazione di basse dosi (10 µg) che di alte dosi (100 µg) di estradiolo a ratti femmina durante il periodo perinatale induce diverse alterazioni in età adulta, tra cui aciclicità, assenza di ovulazione, atrofia delle ovaie e perdita del feedback sia positivo che negativo tra estradiolo e LH (Ikeda et al., 2001; Pinilla et al., 2002; Kouki et al., 2003; Kanaya & Yamanouchi, 2012). In accordo, il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che il

trattamento neonatale di ratti femmina con una singola dose di estradiolo (10 µg) induce drastiche alterazioni a livello ovarico (perdita di un normale ciclo estrale, ritardo dell'apertura vaginale e atrofia dell'utero e delle ovaie), associate ad un comportamento agonistico/dominante e ad una marcata diminuzione dei comportamenti sessuali femminili tipici in età adulta (Berretti et al., 2014). Inoltre, il trattamento neonatale di ratti femmina con estradiolo induce una drastica e persistente riduzione dei livelli plasmatici, cerebrocorticali ed ipotalamici di progesterone e del suo metabolita neuroattivo allopregnanolone associata sia ad alterazione dell'espressione del recettore di tipo A per l'acido γ -aminobutirrico (GABA_A) a livello cerebrocorticale sia ad aumento della sensibilità all'effetto dei farmaci ansiolitici (Calza et al., 2010; Berretti et al., 2014).

Steroidi neuroattivi

Gli steroidi neuroattivi sono steroidi di natura endogena o sintetica in grado di alterare l'eccitabilità neuronale mediante un'azione rapida e diretta a livello di specifici recettori di membrana per i neurotrasmettitori (Majewska et al., 1986; Paul & Purdy, 1992; Lambert et al., 1995). Le cellule gliali (oligodendrociti e astrociti) e le cellule neuronali sono capaci di sintetizzare steroidi ex novo a partire dal colesterolo, attraverso una via biosintetica che richiede l'attività del citocromo P450 e che porta alla formazione di pregnenolone (Hu et al., 1987; Le Goascogne et al., 1987; Ukena et al., 1998) (Figura 2). Gli steroidi sintetizzati direttamente dal cervello, con un processo simile ma indipendente, da quello utilizzato in periferia dalle gonadi e dai surreni, vengono denominati "neurosteroidi".

Il pregnenolone può subire diversi destini metabolici (Figura 2). Uno di questi porta alla formazione di progesterone ad opera di una 3β -idrossisteroide deidrogenasi (3β -HSD). Il progesterone può essere ulteriormente metabolizzato in 5α -diidroprogesterone (5α -pregnane-3,20-dione, o 5α -DHP) dall'enzima 5α -reduttasi, e quindi ulteriormente convertito in allopregnanolone (3α -idrossi- 5α -pregnan-20-one, o $3\alpha,5\alpha$ -tetraidroprogesterone, o $3\alpha,5\alpha$ -THP) dall'enzima 3α -idrossisteroide deidrogenasi (3α -HSD). Il progesterone può essere inoltre metabolizzato in 11-deossicorticosterone (DOC) per azione dell'enzima P450_{C21} (21-idrossilasi), il quale è a sua volta trasformato in diidrideossicorticosterone (5α -DHDOC) per azione della 5α -reduttasi, e successivamente in $3\alpha,5\alpha$ -tetraidrideossicorticosterone ($3\alpha,5\alpha$ -THDOC) ad opera della 3α -HSD. Infine

per azione dell'enzima P450_{C17} (17 α -idrossilasi), il progesterone, attraverso la produzione degli intermedi 17-idrossi-progesterone e androstenedione, può essere convertito in testosterone, il quale per opera di un'aromatasi, viene metabolizzato in estradiolo. Anche il pregnenolone, attraverso un'altra via biosintetica che prevede l'intervento dell'enzima P450_{C17}, viene idrossilato a 17-idrossi-pregnenolone e successivamente a deidroepiandrosterone (DHEA), il quale può essere convertito in testosterone attraverso composti intermedi, e quindi in estradiolo (Figura 2).

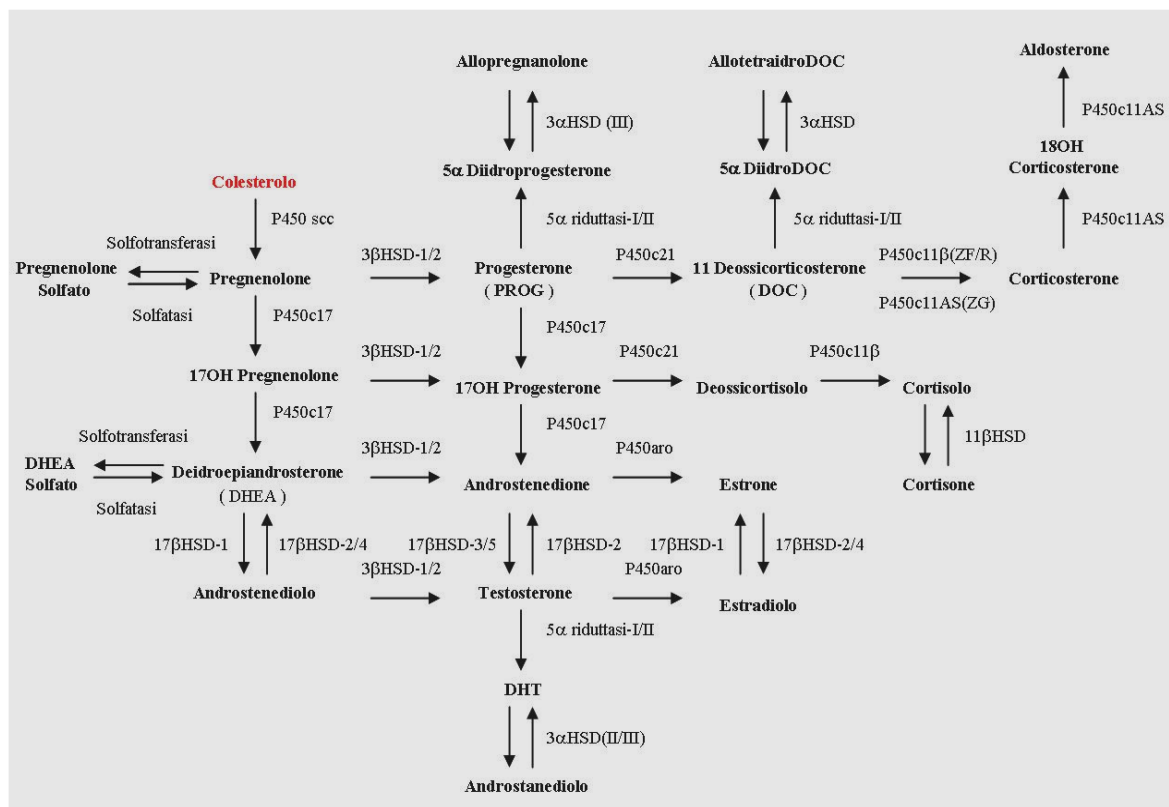


Figura 2. Biosintesi degli steroidi.

Tra i sistemi di neurotrasmissione coinvolti nell'azione degli steroidi neuroattivi (Figura 3) è compresa la famiglia dei recettori ionotropici di tipo A per l'acido γ -aminobutirrico (GABA_A), il neurotrasmettitore a carattere inibitorio più diffuso nel sistema nervoso centrale dei mammiferi, i recettori di tipo 5-HT₃ per la serotonina (Wetzel et al., 1998), i recettori di tipo nicotinico per l'acetilcolina (Valera et al., 1992), i recettori per la glicina (Wu et al., 1990) e la famiglia dei recettori per l'acido glutammico, che comprende i recettori per l'N-metil-D-aspartato (NMDA), per l'acido α -amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolepropionico (AMPA) e per l'acido kainico (Wu et al., 1991; Park-Chung et al.,

1994; Weaver et al., 1997). Gli steroidi neuroattivi modulano anche i recettori presinaptici Sigma-1 (Monnet et al., 1995) e i canali al calcio voltaggio-dipendenti (Rupprecht, 2003). Il recettore per l'ossitocina è stato inoltre indicato come il primo recettore associato a proteine G, in cui si possono legare gli steroidi (Grazzini et al., 1998). Infine, studi più recenti hanno evidenziato un'azione dell'allopregnanolone sui recettori nucleari xenobiotici per il pregnano (PXR; Frye et al., 2012).

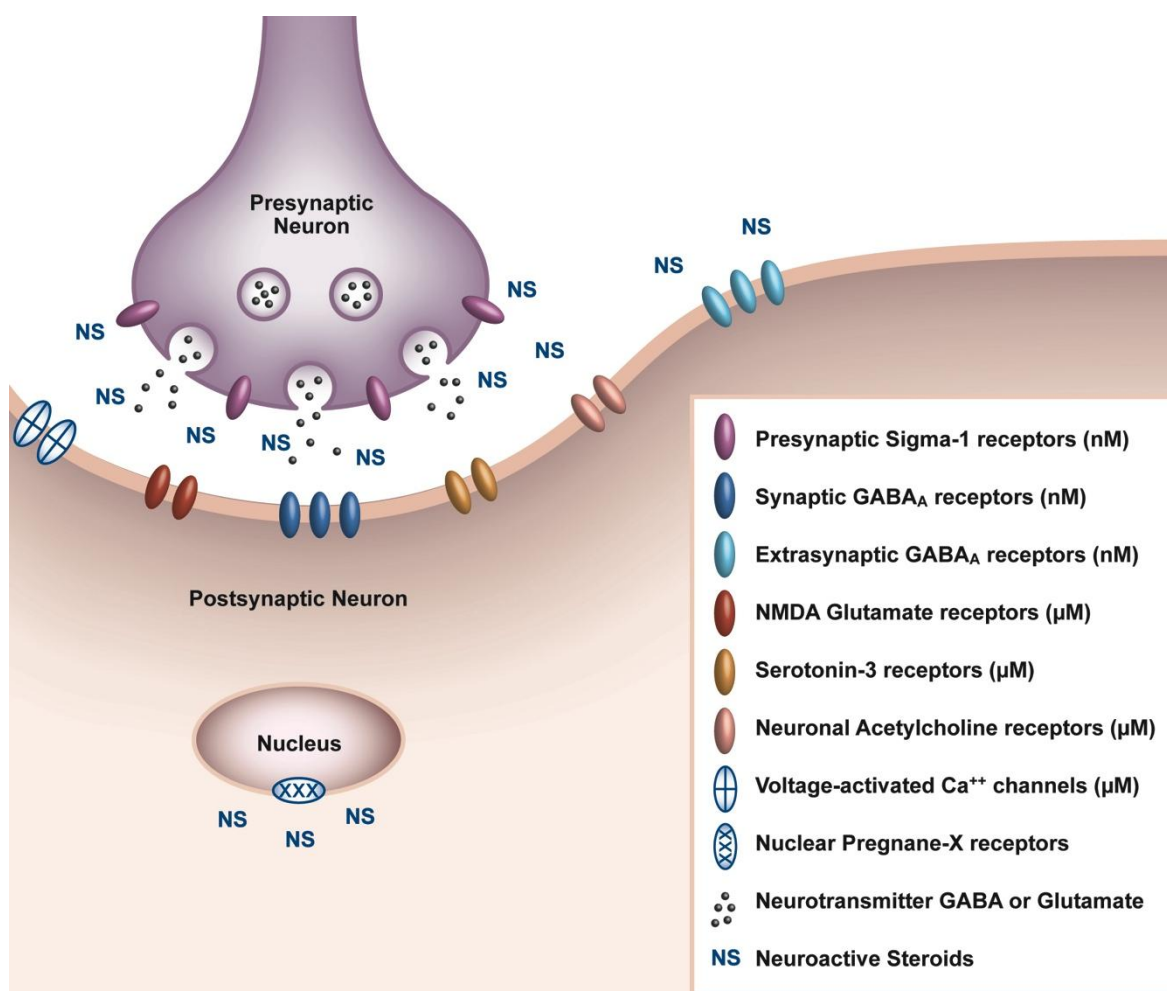


Figura 3. Siti d'azione degli steroidi neuroattivi (Tratta da Morrow & Porcu, 2014).

Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che i derivati del progesterone, allopregnanolone e THDOC, sono sia in vivo sia in vitro, tra i più potenti ed efficaci modulatori allosterici positivi endogeni del recettore GABA_A (Majewska et al., 1986; Paul & Purdy, 1992; Lambert et al., 1995) (Figura 4). Questi steroidi, interagendo con il

recettore GABA_A, mediano effetti ansiolitici, anticonvulsivanti, sedativo-ipnotici ed anestetici, simili a quelli indotti da altri modulatori allosterici positivi del recettore GABA_A come le classiche benzodiazepine ed i barbiturici (Mendelson et al., 1987; Belelli et al., 1989; Bitran et al., 1991; Concas et al., 1996; Carver & Reddy, 2013). Un effetto ansiolitico si osserva anche in seguito all'aumento dei livelli di allopregnanolone endogeno dopo somministrazione sistemica del suo precursore progesterone (Bitran et al., 1993; Bitran et al., 1995).

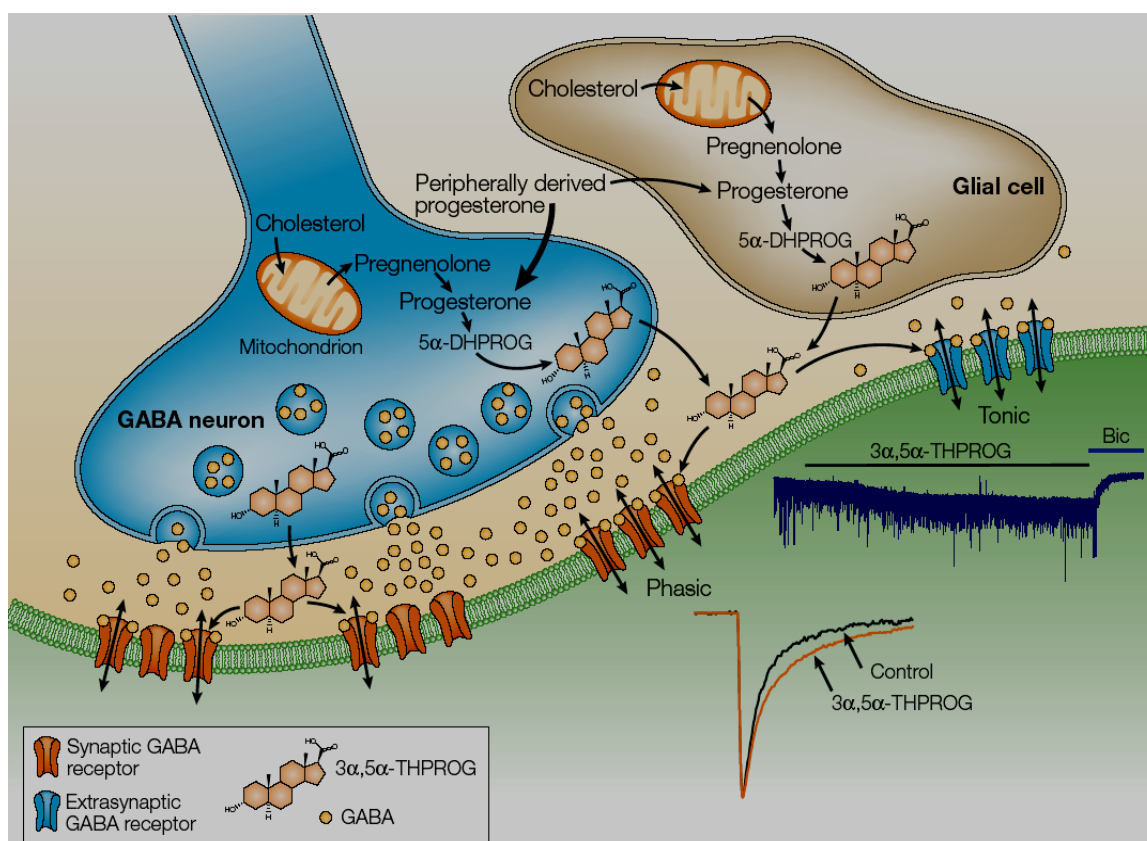


Figura 4. Steroidi neuroattivi e modulazione della trasmissione GABAergica (Tratta da Belelli & Lambert, 2005).

In aggiunta a questi effetti, gli steroidi neuroattivi hanno anche effetti antidepressivi (Khisti et al., 2000), analgesici (Kavaliers & Wiebe, 1987) amnesici (Ladurelle et al., 2000; Johansson et al., 2002), attivano il circuito della gratificazione (Finn et al., 1997; Sinnott et al., 2002) e promuovono il comportamento sessuale in ratti femmina (Frye et al., 1998; Santoru et al., 2014). Più recentemente è stato scoperto che gli steroidi neuroattivi svolgono anche azioni neuroprotettive e neurotrofiche in diverse patologie neurodegenerative (Brinton, 2013; Guennoun et al., 2015).

Le concentrazioni di steroidi neuroattivi si modificano in diverse condizioni fisiologiche associate a sviluppo, pubertà, ciclo ovarico, gravidanza, menopausa e risposta allo stress (Morrow & Porcu, 2014). Esse sono inoltre alterate in diverse patologie neuropsichiatriche come ansia, depressione, sindrome premestruale, disturbo post-traumatico da stress, schizofrenia, disturbo bipolare, dipendenza da alcol, epilessia, e neurodegenerative come malattia di Alzheimer, morbo di Parkinson, sclerosi multipla, neuropatia diabetica (Brinton, 2013; Morrow & Porcu, 2014; Guennoun et al., 2015).

CAPITOLO 1

Effetto della somministrazione neonatale di estradiolo sulla struttura e funzione dei recettori GABA_A nell'ippocampo di ratto adulto

Il GABA è il principale neurotrasmettitore inibitorio del sistema nervoso centrale e agisce legandosi a specifici recettori denominati GABA_A e GABA_B. Dal punto di vista strutturale, il recettore GABA_A è un complesso macromolecolare costituito da cinque diverse subunità glicoproteiche (Nayeem et al., 1994; Tretter et al., 1997) che, assemblandosi tra loro mediante forze non covalenti e disponendosi attorno ad un asse centrale, delimitano un canale permeabile allo ione cloro (Barnard et al., 1998; Whiting, 1999). Il GABA, interagendo con il suo sito di riconoscimento, aumenta la probabilità di apertura del canale ed esplica la sua azione inibitoria iperpolarizzando la membrana cellulare (DeLorey & Olsen, 1992). Su questo complesso macromolecolare sono presenti, oltre al sito di legame per il GABA e per i suoi agonisti (muscimolo) ed antagonisti (bicucullina), anche altri siti di legame sia per modulatori positivi come gli steroidi neuroattivi, le benzodiazepine, i barbiturici, l'etanolo e gli anestetici generali, sia per modulatori negativi come gli agenti convulsivanti TBPS e picrotossina, o le β -carboline, agonisti inversi del recettore per le benzodiazepine (Figura 5).

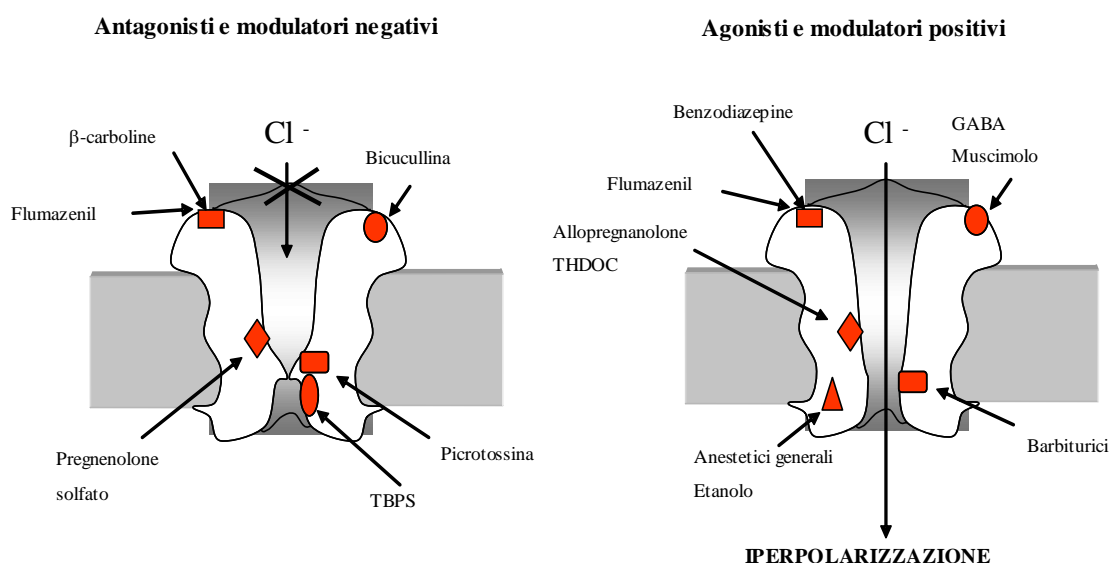


Figura 5. Antagonisti, agonisti e modulatori del recettore GABA_A.

Grazie a tecniche di clonazione molecolare sono state identificate nel sistema nervoso centrale dei mammiferi diverse subunità, ciascuna con rispettive isoforme (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π , ρ_{1-3} e θ) che compongono il recettore GABA_A (Barnard et al., 1998; Whiting, 1999; Pirker et al., 2000; Sieghart & Sperk, 2002). La conformazione più diffusa è quella in cui sono presenti due subunità di tipo α , due β ed una γ ($2\alpha_n2\beta_n\gamma_n$) (Figura 6).

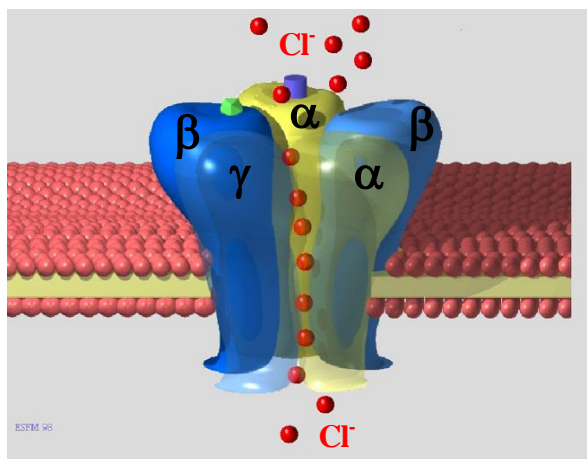


Figura 6. Struttura del recettore GABA_A.

Il sito di legame per il GABA si trova all'interfaccia delle subunità α e β (Smith & Olsen, 1995), quello per le benzodiazepine è collocato all'interfaccia delle subunità α e γ (Siegel, 2002), e quello per gli steroidi neuroattivi è sulla subunità α (Hosie et al., 2006).

La presenza di un numero così ampio di subunità proteiche del recettore GABA_A porta alla formazione di numerosi sottotipi recettoriali, ciascuno con specifiche proprietà fisiologiche e con diversa sensibilità all'azione di ligandi endogeni ed esogeni, che agiscono a livello del recettore (Barnard et al., 1998; Mehta & Ticku, 1999; Rudolph et al., 2001; Olsen & Sieghart, 2008; Rudolph & Knoflach, 2011). Per esempio, per quanto riguarda le benzodiazepine, è stato dimostrato che la subunità $\alpha 1$ è implicata nell'effetto sedativo, amnesico e in parte anticonvulsivante (McKernan et al., 2000), la subunità $\alpha 2$ in quello ansiolitico (Löw et al., 2000) e la subunità $\alpha 3$ in quello miorilassante e in parte ansiolitico (Whiting, 1999; Olsen & Sieghart, 2008; Rudolph & Knoflach, 2011). È stato inoltre dimostrato che le subunità $\alpha 4$ e $\alpha 6$ sono insensibili all'effetto delle benzodiazepine, mentre la subunità $\alpha 5$ è implicata negli effetti amnesici ed è coinvolta nei fenomeni di tolleranza nei confronti di questi farmaci (Wisden et al., 1991; Wafford et al., 1996; Benke et al., 1997; Rudolph & Möhler, 2014). È pertanto evidente che specifiche conformazioni del

recettore GABA_A sono associate alla diversa sensibilità alle benzodiazepine, ma anche a modulatori endogeni come l'allopregnanolone o lo stesso GABA, sulla base della presenza o meno delle specifiche subunità (Brown et al., 2002). In particolare, il sottotipo recettoriale $\alpha\beta\gamma$ è responsabile della sensibilità al diazepam e conferisce al recettore una ridotta sensibilità all'allopregnanolone e bassa affinità per il GABA, mentre il sottotipo recettoriale $\alpha\beta\delta$ è in grado di aumentare la sensibilità all'allopregnanolone e l'affinità per il GABA, conferendo allo stesso tempo insensibilità alle benzodiazepine (Nusser & Mody, 2002; Cope et al., 2005; Olsen & Sieghart, 2008; Carver & Reddy, 2013; Fritschy & Panzanelli, 2014; Rudolph & Möhler, 2014) (Figura 7).

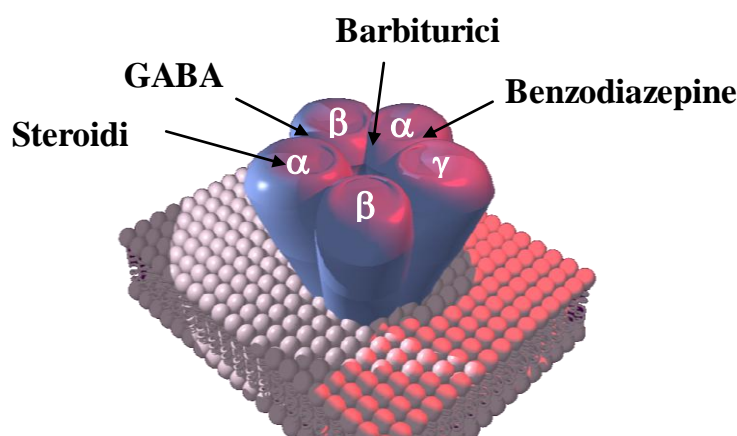


Figura 7. Differente affinità delle subunità del recettore GABA_A per i ligandi endogeni e di sintesi.

Studi di immunoistochimica hanno evidenziato che a livello sinaptico il sottotipo prevalente di recettore GABA_A è quello $\alpha\beta\gamma$. Al contrario, i recettori contenenti le subunità $\alpha\beta\delta$ sono localizzati nella regione perisinaptica, ovvero a circa 30 μm di distanza dal centro della sinapsi, e nella regione extrasinaptica (Tretter & Moss, 2008). La differente localizzazione di questi sottotipi recettoriali si riflette in una differente tipologia d'inibizione che, nel caso dei recettori localizzati nella regione sinaptica, è mediata da una corrente "fasica", mentre per quelli extrasinaptici è detta "tonica" (Farrant & Nusser, 2005). I recettori extrasinaptici vengono attivati da basse concentrazioni di GABA nell'ordine nanomolare (Saxena & Macdonald, 1996; Wallner et al., 2003), attraverso un meccanismo detto di "spill-over" da parte del GABA (Farrant & Nusser, 2005; Glykys & Mody, 2007). I recettori contenenti la subunità δ hanno un basso livello di

desensitizzazione e un'elevata affinità per il GABA. Queste caratteristiche gli conferiscono la capacità di mediare la corrente di tipo tonico, ovvero un tipo di corrente continua che mantiene un costante tono inibitorio. Nonostante l'elevata affinità dei recettori extrasinaptici per il GABA, questo neurotrasmettitore si comporta come un potente ma poco efficace agonista nel mediare la corrente tonica in molti neuroni del sistema nervoso centrale. Evidenze sperimentali hanno dimostrato che questi recettori possono essere efficacemente modulati in modo da aumentare l'affinità da parte del GABA verso il suo sito di legame, e questo è ciò che per esempio accade in presenza degli steroidi neuroattivi (Belelli et al., 2002; Wohlfarth et al., 2002; Bianchi & Macdonald, 2003).

Steroidi neuroattivi e plasticità del recettore GABA_A

Il significato fisiologico dell'azione degli steroidi neuroattivi in vivo sui recettori GABA_A è stato studiato in relazione allo stress (Purdy et al., 1991; Zinder & Dar, 1999; Barbaccia et al., 2001; Serra et al., 2007; Porcu & Morrow, 2014), durante lo sviluppo (Cooper et al., 1999; Grobin & Morrow, 2001), il ciclo estrale (Maguire et al., 2005; Lovick, 2006; Sabaliauskas et al., 2015), la pubertà (Shen et al., 2007; Shen et al., 2010), la gravidanza (Concas et al., 1998; Maguire & Mody, 2008; Sanna et al., 2009), in relazione a trattamenti farmacologici come l'assunzione di contraccettivi ormonali (Follesa et al., 2002; Porcu et al., 2012; Santoru et al., 2014), l'assunzione di progesterone (Smith et al., 1998a; Smith et al., 1998b; Gulinello & Smith, 2003), finasteride (Modol et al., 2014), benzodiazepine (Follesa et al., 2001) o etanolo (Morrow et al., 1991; Kumar et al., 2009). Da questi studi è emerso che fluttuazioni nelle concentrazioni degli steroidi neuroattivi sono in grado di modulare la funzione e l'espressione genica delle differenti subunità del recettore GABA_A in maniera specifica (Smith et al., 1998a; Smith et al., 1998b; Follesa et al., 2002; Bitran & Smith, 2005; Shen et al., 2005; Porcu et al., 2012; Modol et al., 2014).

Ad esempio, le concentrazioni di steroidi neuroattivi variano durante lo sviluppo; nel ratto, i livelli cerebrali di allopregnanolone sono elevati nell'embrione, diminuiscono alla nascita, aumentano intorno al 10°-14° giorno e poi diminuiscono nuovamente all'inizio della pubertà (Grobin & Morrow, 2001; Shen & Smith, 2009). Alterazioni di questi livelli inducono modificazioni nell'espressione dei recettori extrasinaptici $\alpha 4\beta\delta$ e nello stato emozionale degli animali (Darbra et al., 2014).

Gli steroidi neuroattivi fluttuano anche durante il ciclo estrale: le concentrazioni cerebrali di allopregnanolone aumentano durante la fase di diestro nel topo (Corpéchet et al., 1997), e in parallelo si osserva una diminuzione nell'espressione della subunità $\gamma 2$ e un aumento nell'espressione della subunità δ del recettore GABA_A, con conseguente aumento dell'inibizione tonica (Maguire et al., 2005). Simili fluttuazioni si osservano anche durante la gravidanza. Numerose evidenze hanno inoltre dimostrato che in questo periodo si assiste ad un aumento molto marcato e costante delle concentrazioni di allopregnanolone nel cervello e nel plasma di ratto (Concas et al., 1998) e nel plasma umano (Pearson Murphy et al., 2001; Paoletti et al., 2006), e che tali livelli calano drasticamente poco prima del parto (Concas et al., 1998). Nella gravidanza inoltre, parallelamente al progressivo aumento dei livelli di progesterone e del suo metabolita allopregnanolone, si osservano modificazioni nell'espressione genica del recettore GABA_A, come dimostrano la diminuzione del RNA messaggero (mRNA) codificante per la subunità $\gamma 2$ del recettore GABA_A (Concas et al., 1998; Follesa et al., 1998) e l'aumento dell'espressione della subunità δ (Maguire & Mody, 2008; Sanna et al., 2009). Queste modificazioni sono dovute alle fluttuazioni nelle concentrazioni cerebrali dell'allopregnanolone, dal momento che il trattamento con finasteride, un inibitore della 5 α -reduttasi (Rittmaster, 1994; Azzolina et al., 1997), riduce drasticamente i livelli di allopregnanolone nel cervello e nel plasma dei ratti e previene le variazioni nell'espressione e nella funzione del recettore GABA_A (Concas et al., 1998; Maguire & Mody, 2008; Sanna et al., 2009).

Inoltre, è stato dimostrato che il trattamento cronico con una combinazione di etinilestradiolo e levonorgestrel, due fra i composti più frequentemente utilizzati nella preparazione dei contraccettivi orali, induce una marcata e persistente diminuzione dei livelli cerebrocorticali e plasmatici di allopregnanolone e dei suoi precursori progesterone e pregnenolone (Follesa et al., 2002). Questo effetto, indotto dai contraccettivi, è associato ad una modificazione dell'espressione genica del recettore GABA_A nella corteccia cerebrale di ratto. In particolare, è stato osservato un significativo aumento dei livelli cerebrocorticali dell'mRNA che codifica per le subunità $\gamma 2$ e della relativa proteina del recettore GABA_A.

La modulazione dell'espressione genica delle differenti subunità del recettore GABA_A avviene verosimilmente attraverso un meccanismo di tipo sinaptico recettore-mediato nel quale l'interazione del recettore GABA_A con gli steroidi neuroattivi, così come con farmaci come le benzodiazepine e l'etanolo (Morrow et al., 1991; Follesa et al., 2001), può indurre

all'interno della cellula l'attivazione di secondi messaggeri non ancora ben identificati, che, interagendo con specifiche sequenze del DNA, possono modificare la trascrizione dei geni per le subunità del recettore, promuovendo la sintesi di nuovi recettori GABA_A con differente farmacologia.

Nel loro insieme queste evidenze sperimentali suggeriscono dunque che variazioni fisiologiche o farmacologiche delle concentrazioni di steroidi neuroattivi nel cervello, modificando la funzione e l'espressione dei recettori GABA_A, potrebbero avere possibili conseguenze sulla regolazione dell'eccitabilità neuronale esercitata dalla trasmissione GABAergica.

Obiettivo

Poiché le fluttuazioni dell'allopregnanolone influenzano la plasticità dei recettori GABA_A e l'esposizione neonatale ad estradiolo induce, in ratti femmina adulti, una drastica e persistente riduzione dei livelli ipotalamici, cerebrocorticali e plasmatici di progesterone e del suo metabolita neuroattivo allopregnanolone (Calza et al., 2010; Berretti et al., 2014), l'obiettivo è stato quello di valutare se il trattamento neonatale con estradiolo fosse in grado di modificare, nell'ippocampo di ratto adulto, le concentrazioni di questi steroidi neuroattivi, l'espressione dei recettori GABA_A extrasinaptici e sinaptici, e le correnti, tonica e fasica, mediate da questi recettori.

Metodi

Animali

Per gli esperimenti sono stati utilizzati ratti femmina Sprague-Dawley allevati nello stabulario dell'Università degli Studi di Cagliari da genitori provenienti dalla ditta Charles River. Gli animali sono stati stabulati, sei per ogni gabbia, con un ciclo artificiale luce:buio di 12:12 ore (luce dalle 08:00 alle 20:00), ad una temperatura costante di $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e un'umidità relativa del 65%. Gli animali hanno avuto libero accesso all'acqua e al cibo per l'intero periodo sperimentale. Le procedure sperimentali sono state condotte in accordo con la legge 2010/63/UE, emanata dal Parlamento Europeo il 22 Settembre 2010, e sono

state approvate dall'Organismo Per il Benessere Animale (OPBA) dell'Università degli Studi di Cagliari.

Trattamento neonatale con estradiolo benzoato

I ratti femmina sono stati fatti accoppiare con i maschi ad intervalli regolari. Circa 4 ore dopo il parto, i neonati maschi sono stati rimossi dalla nidiata; le femmine sono state sottoposte al trattamento con estradiolo benzoato (10 µg/animale, Sigma-Aldrich) (Figura 8). L'estradiolo è stato sciolto in olio di sesamo (Sigma-Aldrich) mediante ultrasuoni per 2 ore, ed è stato iniettato sottocute, previa anestesia ipotermica, in un volume di 50 µl per animale (Rodriguez et al., 1993; Solum & Handa, 2002; Calza et al., 2010; Berretti et al., 2014). Gli animali di controllo hanno ricevuto un uguale volume di olio di sesamo. Ciascun ratto ha ricevuto una singola somministrazione di estradiolo il giorno della nascita (giorno 0) circa 4 ore dopo il parto. Al risveglio dall'anestesia le neonate sono state restituite alle madri. Ciascuna madre ha ricevuto 5-8 ratti trattati o con estradiolo o con olio di sesamo.

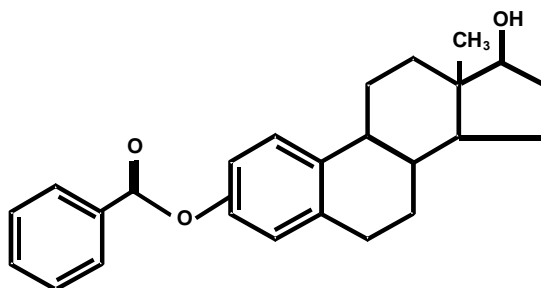


Figura 8. Struttura molecolare dell'estradiolo benzoato.

Gli animali sono stati svezzati regolarmente a 21 giorni di età. Tutti gli esperimenti sono stati condotti su ratti adulti (60-90 giorni di età).

Monitoraggio del ciclo estrale

Gli animali, a partire dal 55° giorno di vita e fino al giorno del sacrificio, sono stati sottoposti giornalmente (ore 8:00) a strisci vaginali allo scopo di determinare la ciclicità

estrale. I ratti manifestano un ciclo estrale dopo l'apertura dell'orifizio vaginale, evento che in genere avviene tra il 32° ed il 36° giorno dopo la nascita dell'animale. Nonostante ci siano delle differenze nel tempo di apertura vaginale, inizialmente i ratti vanno incontro ad un ciclo irregolare (Goldman et al., 1988-1989) prima di manifestare un modello ovulatorio ciclico costante che dura dai 4 ai 5 giorni. In un ciclo normale di 4 giorni (Figura 9), la fase del proestro è identificabile dalla presenza di gruppi di cellule epiteliali rotonde e nucleate che mostrano spesso un aspetto granulare al microscopio. La fase di proestro dura un giorno ed è seguita dalla fase di estro vaginale, normalmente identificabile per la presenza di un gran numero di cellule cornificate o più cellule rotonde con margini spessi. La predominanza delle cellule cornificate dura circa un giorno nel ciclo a 4 giorni, fino a 2 giorni consecutivi nel ciclo a 5 giorni. Il diestro 1 o metestro è la fase successiva all'estro, dove gli strisci vaginali sono caratterizzati dalla combinazione di leucociti, cellule cornificate e cellule epiteliali rotonde. L'ultima fase del ciclo estrale è quella del diestro 2, in cui gli strisci vaginali sono caratterizzati dalla predominanza di leucociti, solitamente insieme a residui cellulari. La concentrazione di leucociti visibili al microscopio può variare, e gli strisci vaginali possono essere spesso esclusivamente composti da tali cellule (Goldman et al., 2007).

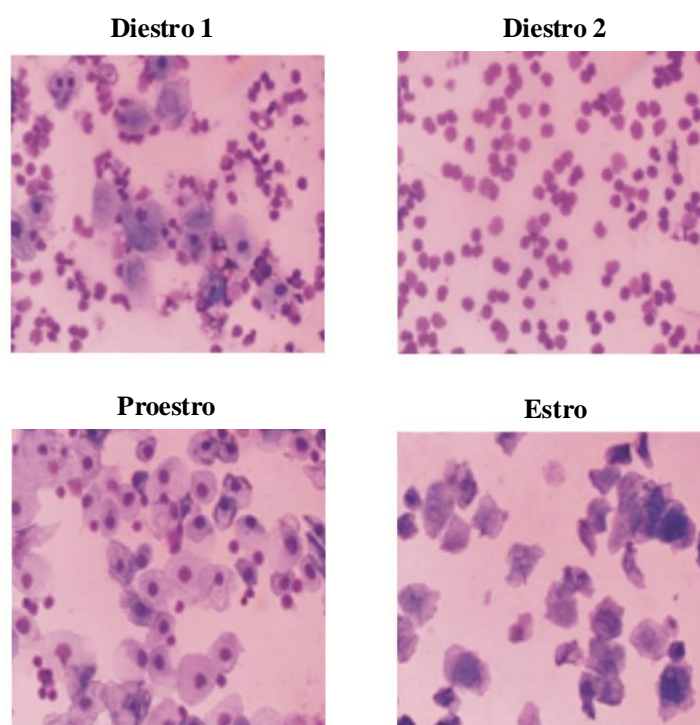


Figura 9. Citologia del ciclo estrale nel ratto.

Estrazione e misurazione degli steroidi cerebrali e plasmatici mediante dosaggio radioimmunologico (RIA)

Dopo il sacrificio degli animali, il cervello è stato rapidamente estratto (<1 minuto) e le aree cerebrali dissezionate e congelate in ghiaccio secco per essere poi conservate a -80°C fino all'analisi degli steroidi. Il sangue è stato raccolto dal corpo degli stessi animali in provette eparinizzate e centrifugato a 1000 g per 15 minuti, in modo da separare il plasma (circa 1 ml) che è stato congelato a -80°C fino all'analisi degli steroidi.

Le concentrazioni di steroidi sono state misurate con dosaggio radioimmunologico (RIA) previa estrazione e purificazione (Calza et al., 2010; Porcu et al., 2012; Berretti et al., 2014). Gli steroidi, presenti nell'omogenato di ippocampo (120 mg di tessuto in 1 ml di tampone fosfato) di ogni singolo ratto, sono stati estratti quattro volte con un ugual volume di acetato di etile. La fase organica è stata fatta evaporare sottovuoto, il residuo è stato risospeso in 4 ml di n-esano, caricato su una colonna di silica Seppak (Waters) e i suoi componenti sono stati eluiti con una miscela di n-esano e 1-propanolo (7:3; vol:vol). Gli steroidi sono stati ulteriormente purificati mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC), utilizzando una colonna di Lichrosorb-diolo (250 mm x 4 mm; Phenomenex) sviluppata con un gradiente di 1-propanolo in n-esano (da 0 a 30%). Dal momento che il colesterolo viene eluito dalla colonna di Lichrosorb-diolo insieme al progesterone e poiché esso riduce la sensibilità del RIA per il progesterone, la frazione eluita dalla colonna corrispondente a quest'ultimo steroide, è stata ulteriormente purificata dal colesterolo tramite due lavaggi con 200 µl di dimetilsolfossido (Sigma-Aldrich) ed uno con 400 µl di acqua distillata. Il progesterone è stato quindi estratto per quattro volte dalla fase acquosa con 1.5 ml di n-esano. Il recupero di ciascuno steroide attraverso le varie fasi di estrazione e purificazione (dal 60 al 80%) è stato monitorato tramite l'aggiunta di steroidi traccianti triziati (Perkin Elmer, 8000 cpm) all'omogenato di tessuto cerebrale prima dell'estrazione. Le concentrazioni plasmatiche degli steroidi sono state misurate in 1 ml di plasma estratto per quattro volte con 3 ml di acetato di etile.

L'analisi quantitativa degli steroidi è stata effettuata mediante RIA con anticorpi specifici per il progesterone, il DHEA, l'allopregnanolone, il THDOC ed i relativi steroidi triziati (circa 8000 cpm). Gli anticorpi per il progesterone e il DHEA sono stati acquistati dalla ditta MP Biomedicals. Gli anticorpi per l'allopregnanolone ed il THDOC sono stati ottenuti dal coniglio e dalla pecora rispettivamente, e caratterizzati dal Dott. R. H. Purdy

(Scripps Research Institute, San Diego, CA, USA) come precedentemente descritto (Purdy et al., 1990).

Preparazione delle membrane cellulari per Western blot

La quantità proteica delle subunità del recettore GABA_A è stata misurata nelle frazioni sinaptica ed extrasinaptica di membrane cellulari di ippocampo in accordo con precedenti protocolli (Goebel-Goody et al., 2009; Carlson et al., 2014). La preparazione dei tessuti è avvenuta costantemente alla temperatura di +4°C al fine di ridurre al minimo l'attività enzimatica. Gli ippocampi sono stati rapidamente estratti dal cervello degli animali sacrificati (<1 minuto) e omogenati con un pestello in teflon (6-7 strokes) in 10 volumi (peso/volume) di tampone ghiacciato (saccarosio 0.32 M). L'omogenato è stato centrifugato a 1000 g per 10 minuti al fine di permettere la precipitazione dei nuclei e della componente tissutale non perfettamente omogenata. Il surnatante è stato quindi centrifugato due volte a 12000 g per 30 minuti. Il pellet è stato risospeso in tampone fosfato (PBS; NaOH 136 mM, KCl 2.68 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM, Na₂HPO₄ 10.14 mM; pH 7.4) per ottenere la frazione di membrana totale. La frazione sinaptica è quindi stata separata dalla frazione extrasinaptica mediante incubazione a +4°C in PBS contenente Triton X-100 allo 0.5%, dal momento che le proteine facenti parte della porzione postsinaptica e della giunzione sinaptica sono insolubili al Triton X-100 (Goebel-Goody et al., 2009). Dopo l'incubazione, l'omogenato è stato centrifugato due volte a 32000 g per 30 minuti e il pellet ottenuto (rappresentante la frazione sinaptica) è stato risospeso in PBS, aliquotato e conservato a -80°C fino all'uso. Il supernatante è stato incubato overnight in acetone (rapporto 1:8 surnatante:acetone) a -20°C. Il giorno seguente, la soluzione risultante è stata centrifugata due volte a 12000 g per 30 minuti; la frazione extrasinaptica, così ottenuta, è stata infine aliquotata e conservata a -80°C fino all'uso.

La concentrazione delle proteine è stata determinata mediante l'utilizzo del kit DC Protein Assay (Bio-Rad) che si basa sui principi del metodo di Lowry.

Western blot

Un'uguale quantità di proteine totali (40 µg) è stata diluita in un mix di tampone LDS e agente riducente (Life Technologies), ed è stata sottoposta a corsa elettroforetica (200 volts

costanti per 45 minuti) in gel a gradiente 4-12% (NuPAGE Novex, Life Technologies). Le proteine, una volta separate, sono state trasferite elettroforeticamente (75 volts costanti per 1 ora) in membrane di PVDF (GE Healthcare). Al termine del trasferimento, le membrane sono state sottoposte a tre lavaggi da 5 minuti con il tampone TBS-T (Tris 20 mM; NaCl 137 mM; Tween-20 1 ml/L; pH 7.6). Le membrane sono state quindi saturate per 1 ora a temperatura ambiente con latte magro in polvere al 5% (peso/volume) sciolto in tampone TBS-T. Infine le membrane sono state incubate overnight a +4°C con l'anticorpo primario specifico per le diverse proteine misurate: anti-GABA_A α 1, α 2 e α 4 (Santa Cruz Biotechnology, 1:100), anti-GABA_A γ 2 e δ (PhosphoSolutions, 1:500), anti-GAPDH (Millipore, 1:1000). Tutti gli anticorpi suddetti sono stati diluiti in tampone TBS-T contenente il 5% (peso/volume) di latte magro in polvere e conservati a +4°C.

Al termine dell'incubazione overnight con l'anticorpo primario, sono stati effettuati tre lavaggi da 15 minuti con il tampone TBS-T, e le membrane sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario (scelto di volta in volta tenendo conto della specie animale in cui è stato prodotto l'anticorpo primario utilizzato) coniugato alla perossidasi di rafano (HRP, Bio-Rad). Gli anticorpi secondari sono stati utilizzati alla diluizione di 1:10000 (coniglio) o 1:5000 (topo e capra) e diluiti in tampone TBS-T contenente latte magro in polvere al 5% (peso/volume).

L'immunocomplesso è stato rilevato con il metodo della chemiluminescenza (Luminata Forte™ e Luminata Crescendo™ Western HRP Substrate, Millipore). Al termine della reazione di chemiluminescenza, le bande relative alle proteine di interesse e al GAPDH sono state visualizzate mediante fotografia ed analisi dell'immagine scannerizzata.

La quantità delle proteine espresse è stata determinata misurando la densità ottica delle bande corrispondenti sull'immagine scannerizzata con i software di scansione GeneSnap e GeneTools (Perkin Elmer) mediante un sistema di analisi d'immagine a chemiluminescenza Chemi Imaging System, Geliance 600 (Perkin Elmer). Tale strumento è calibrato per individuare i valori saturati, in modo tale che tutte le misure risultino comprese in un intervallo lineare. I dati sono stati normalizzati dividendo la densità ottica di ciascuna banda specifica delle diverse proteine per quella corrispondente alla proteina GAPDH; pertanto la quantità della proteine è stata espressa in unità arbitrarie, e non è stato possibile determinare il valore assoluto delle loro concentrazioni, bensì le variazioni percentuali dei gruppi sperimentali rispetto agli animali di controllo.

Preparazione delle fettine cerebrali per elettrofisiologia

Le fettine cerebrali sono state ottenute da animali appartenenti a differenti gruppi sperimentali in accordo con precedenti protocolli sperimentali (Sanna et al., 2011). Gli animali sono stati anestetizzati con cloroformio e sacrificati. Il cervello è stato rapidamente trasferito in una soluzione di liquido cerebrospinale artificiale (ACSF) modificato contenente saccarosio 220 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 0.2 mM, MgSO₄ 6 mM, NaHCO₃ 26 mM, NaH₂PO₄ 1.3 mM e D-glucosio 10 mM (pH 7.4, aerazione 95% O₂/5% CO₂). Le sezioni coronali cerebrali (300 µm di spessore) contenenti l'ippocampo dorsale sono state ottenute in ACSF modificato al vibratomo (Leica VT1200S, Leica Microsystem). Le fettine sono quindi state trasferite immediatamente in una retina in nylon immersa in una soluzione di ACSF normale contenente NaCl 126 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, NaHCO₃ 26 mM, NaHPO₄ 1.25 mM e D-glucosio 10 mM (pH 7.4, aerazione 95% O₂/5% CO₂) per almeno 40 minuti alla temperatura di 35°C. Successivamente, in seguito a un periodo di incubazione della durata di almeno un'ora a temperatura ambiente, le emifettine sono state trasferite nella camera di registrazione, immerse in ACSF normale a flusso costante di ~2 ml/min. Per quanto riguarda tutte le registrazioni effettuate, la temperatura del bagnetto è stata mantenuta costante a 33°C.

Esperimenti di whole-cell patch clamp

Le registrazioni di whole-cell patch clamp a livello dei neuroni granulari del giro dentato sono state effettuate secondo il protocollo descritto in Sanna et al., 2011. Le pipette di registrazione sono state forgiate a partire da vetro di borosilicato mediante l'utilizzo di un puller per micropipette Fleming Brown (Sutter Instrument). Le registrazioni sono state eseguite in modo che la resistenza delle pipette di registrazione fosse compresa in un range che andava da 2.5 a 4.5 MΩ, dopo essere stata posta al loro interno una soluzione contenente CsCl 150 mM, Hepes 10 mM, lidocaina N-etilbromuro 5 mM, MgCl₂ 2 mM, Mg-ATP 3 mM, Na-GTP 0.3 mM e BAPTA-4K 10 mM, pH portato a 7.2 con CsOH e osmolarità mantenuta a 298 mOsm con l'aggiunta di saccarosio. Al fine di registrare le correnti mediate dai recettori GABA_A, è stato aggiunto acido chinurenico 1 mM alla soluzione di registrazione ACSF extracellulare per bloccare le correnti mediate dai recettori AMPA, kainato e NMDA. I neuroni granulari del giro dentato sono stati clampati a -65

mV. Sono state analizzate solamente le registrazioni con una resistenza in ingresso inferiore ai 25 M Ω (solitamente in un range compreso tra 9 e 20 M Ω). La resistenza in serie non è stata compensata e se la resistenza in ingresso variava più del 20% nel corso della registrazione, la cellula in questione veniva automaticamente scartata. Le correnti sinaptiche sono state registrate mediante l'utilizzo dell'amplificatore Axopatch 200-B (Axon Instruments), filtrate a 2 kHz e digitalizzate a 5 kHz. I parametri di ampiezza, tempo di decadimento e frequenza delle correnti postsinaptiche inibitorie spontanee (sIPSC) sono stati registrati mediante l'utilizzo del software pClamp 9.2 (Axon Instruments) e l'analisi è stata fatta tramite Minianalysis 6.0 (Synaptosoft). A partire dall'inizio della registrazione in whole-cell, sono stati fatti passare almeno 5 minuti in modo da poter raggiungere un livello stabile, quindi è stata registrata l'attività basale per circa 3 minuti. Per gli esperimenti volti a valutare le correnti toniche nei neuroni granulari del giro dentato, è stato applicato l'agonista dei recettori GABA_A α -(4,5,6,7-tetraidroisoxazolo [5,4-c]piridin-3-olo; THIP; 3 μ M) nel bagnetto per 5 minuti al fine di incrementare le correnti toniche; successivamente è stata attuata una co-perfusione con l'antagonista GABA_A bicucullina (20 μ M) al fine di sopprimere sia le correnti sIPSCs sia le correnti toniche. Per valutare differenze nelle alterazioni delle correnti toniche tra i diversi gruppi sperimentali, sono stati considerati i parametri sia di shift che di variazione della holding current.

Analisi statistica

I dati riportati rappresentano la media \pm errore standard della media (SEM) e sono stati analizzati mediante il t-test di Student o l'analisi della varianza (ANOVA) ad una via, seguita dal post hoc test di Bonferroni. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati e discussione

Effetto del trattamento neonatale con estradiolo sui livelli degli steroidi neuroattivi nell'ippocampo di ratti femmina adulti

Una singola somministrazione di estradiolo entro 24 ore dalla nascita induce una marcata e persistente riduzione delle concentrazioni di steroidi neuroattivi nell'ippocampo di ratti femmina adulti (60-90 giorni d'età). Infatti, i risultati ottenuti dimostrano che il trattamento neonatale con estradiolo riduce in maniera significativa i livelli ippocampali di progesterone (-76%, $p<0.0001$; Figura 10a) e di allopregnanolone (-47%, $p=0.015$; Figura 10b).

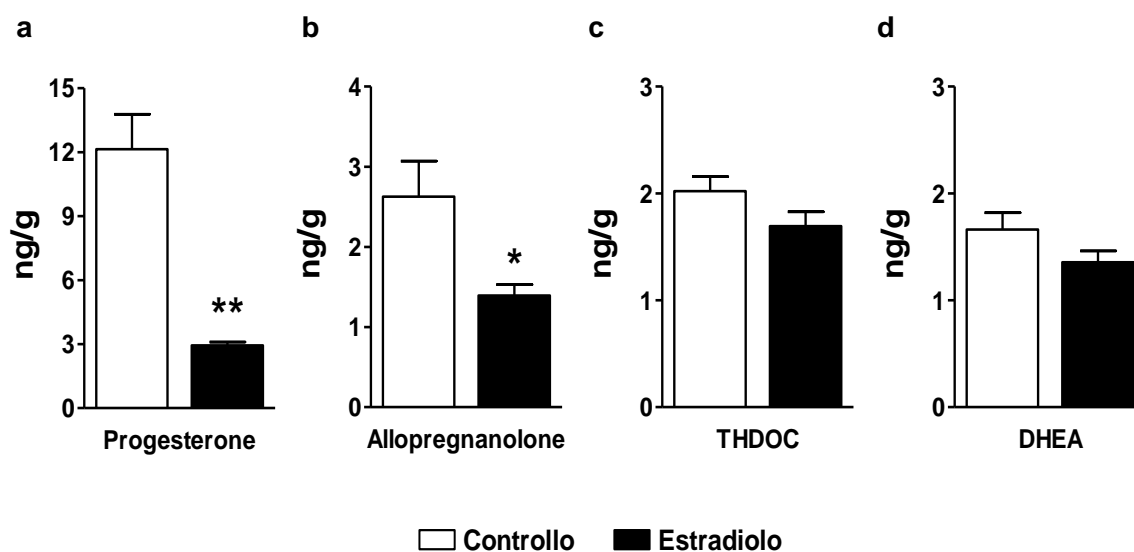


Figura 10. Effetto della somministrazione neonatale di estradiolo sulle concentrazioni ippocampali degli steroidi neuroattivi. Gli animali sono stati trattati entro 24 ore dalla nascita con estradiolo benzoato (10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ /ratto, s.c.) e sacrificati a 60-90 giorni d'età. Gli animali di controllo hanno ricevuto un ugual volume di solvente. I dati sono espressi in nanogrammi di steroide per grammo di tessuto e rappresentano la media \pm SEM di 12 animali per gruppo. * $p<0.05$ e ** $p<0.0001$ vs. gli animali di controllo.

La riduzione delle concentrazioni ippocampali di progesterone e del suo metabolita neuroattivo allopregnanolone è in linea con precedenti evidenze secondo le quali il trattamento neonatale con estradiolo diminuisce marcatamente le concentrazioni di questi steroidi neuroattivi a livello cerebrocorticale, ipotalamico e plasmatico, effetto riscontrato già a partire dal 21° giorno di vita, e che permane in età adulta (Calza et al., 2010; Berretti

et al., 2014). Al contrario, la somministrazione neonatale di estradiolo non induce in questa stessa area cerebrale modificazioni significative nei livelli di THDOC (Figura 10c) e di DHEA (Figura 10d). Questi risultati suggeriscono che il trattamento con estradiolo induce un effetto selettivo sulla via neurosteroidogenica che porta alla sintesi di allopregnanolone. Tale discrepanza potrebbe essere quindi spiegata dalla differente "localizzazione" delle diverse vie biosintetiche coinvolte nella sintesi di questi steroidi. Infatti, diversamente dall'allopregnanolone, che deriva da diversi organi steroidogenici, incluse le gonadi e il cervello (Mellon et al., 2004), il THDOC è quasi esclusivamente di origine surrenalica e quindi potrebbe non essere influenzato dagli effetti del trattamento con estradiolo sull'asse gonadico. Inoltre, la sintesi del DHEA segue, almeno in parte, una via metabolica differente da quella dell'allopregnanolone: il DHEA deriva direttamente dal pregnenolone senza passare per la via di conversione del progesterone. D'altra parte, non si può escludere la possibilità che l'attività o l'espressione degli enzimi specifici che catalizzano la biosintesi degli steroidi neuroattivi possa essere alterata nel cervello delle femmine di ratto trattate con estradiolo.

L'effetto specifico e a lungo termine dell'estradiolo sui livelli di progesterone e di allopregnanolone potrebbe avere alla base meccanismi epigenetici che potrebbero instaurarsi in età precoce per poi mantenersi stabilmente fino all'età adulta. In accordo con quest'ipotesi, è stato dimostrato che l'esposizione ad estrogeni nel periodo perinatale è in grado di disregolare proprio quei meccanismi molecolari che vedono implicati gli estrogeni endogeni e che portano alla corretta sintesi e al conseguente rilascio dell'ormone LH in età adulta, portando in ultimo a mancanza di ovulazione, assenza di un normale ciclo estrale e riduzione della biosintesi di progesterone (Rodriguez et al., 1993; Berretti et al., 2014). Diverse possono essere le cause che sottendono queste modificazioni: l'estrogeno potrebbe a) agire a livello ipotalamico, alterando il rilascio dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH) o la risposta dell'ipofisi a questo fattore ipotalamico; b) alterare direttamente la regolazione della secrezione delle gonadotropine a livello ipofisario o distruggere la funzione ovarica direttamente, inducendo di conseguenza modificazioni nel ciclo ovarico; c) modificare la risposta dell'ipotalamo e dell'ipofisi ai meccanismi di feedback indotti dagli steroidi ovarici, portando ad una disregolazione della secrezione di GnRH ed LH (Foecking et al., 2008). Nonostante l'esatto meccanismo non sia ancora del tutto chiarito, il risultato di tutti questi effetti è l'alterazione della funzione ovarica che induce anovulazione, infertilità e riduzione del rilascio di progesterone. Di conseguenza,

venendo a mancare l'apporto del progesterone dalla periferia, si osserva anche una diminuzione dei livelli cerebrali di questo ormone e del suo metabolita neuroattivo, allopregnanolone.

L'osservazione dell'alterata funzione gonadica e quindi della riduzione del progesterone e del suo metabolita allopregnanolone, è in accordo con l'evidenza sperimentale che il trattamento cronico con contraccettivi ormonali, che, così come la somministrazione neonatale di estradiolo, riduce la funzione endocrina delle ovaie, induce una marcata diminuzione delle concentrazioni cerebrali di questi specifici steroidi (Follesa et al., 2002; Porcu et al., 2012). Come è noto dalla letteratura infatti, nella donna i contraccettivi ormonali inibiscono l'ovulazione e la formazione del corpo luteo diminuendo quindi l'attività del sistema ipotalamo-ipofisi-gonadi e quindi la secrezione pulsatile di LH ed FSH (ormone follicolo-stimolante) da parte dell'ipofisi, riducendo così drasticamente la secrezione ovarica di estrogeni, di progesterone e di conseguenza del suo metabolita 5α -ridotto allopregnanolone (Rapkin et al., 2006). Analogamente a questo meccanismo, anche nel ratto il trattamento cronico con etinilestradiolo e levonorgestrel, due fra i composti steroidei più utilizzati nella preparazione dei contraccettivi ormonali, riduce drasticamente i livelli di LH che ritornano ai valori di controllo entro due settimane dal termine della somministrazione (Kuhl et al., 1984). Questa diminuzione dell'LH è associata ad una drastica riduzione dei livelli cerebrali e plasmatici di progesterone ed allopregnanolone che, anche in questo caso, tornano reversibilmente ai valori di controllo due settimane dopo la fine del trattamento (Follesa et al., 2002; Porcu et al., 2012), indicando che dal momento in cui le ovaie riprendono la loro normale funzione endocrina, vengono ripristinati anche i normali livelli degli steroidi neuroattivi nel cervello e nel plasma.

Effetto del trattamento neonatale con estradiolo sull'espressione e la funzione dei recettori GABA_A nella frazione extrasinaptica dell'ippocampo di ratti femmina adulti

È noto dalla letteratura che variazioni dei livelli di allopregnanolone che si presentano nel corso di diversi eventi fisiologici quali ad esempio pubertà (Shen et al., 2007), ciclo ovarico (Maguire et al., 2005; Maguire & Mody, 2007), gravidanza (Maguire & Mody, 2008; Sanna et al., 2009) e stress (Serra et al., 2007; Sarkar et al., 2011), o in seguito a differenti trattamenti farmacologici (Smith et al., 1998a; Follesa et al., 2001; Modol et al.,

2014) sono in grado di alterare in maniera marcata e specifica l'espressione e la funzione della sottoclasse dei recettori extrasinaptici GABA_A $\alpha 4\beta\delta$. Poichè i ratti femmina trattati il giorno della nascita con estradiolo mostrano una marcata e persistente riduzione dei livelli ippocampali di allopregnanolone in età adulta, è stato valutato se questo effetto fosse associato ad alterazioni nell'espressione dei recettori GABA_A extrasinaptici. A questo scopo, l'espressione di specifiche subunità del recettore GABA_A è stata misurata nella frazione extrasinaptica di membrane di ippocampo di ratti femmina adulti. Inoltre, poiché l'espressione di specifiche subunità del recettore GABA_A varia durante le varie fasi del ciclo estrale in relazione alle fluttuazioni di allopregnanolone (Lovick et al., 2005; Maguire et al., 2005), sono stati utilizzati come controlli ratti femmina adulti trattati alla nascita con olio di sesamo e sacrificati durante le fasi di proestro e di diestro 1 del ciclo estrale. Come già dimostrato in precedenza (Berretti et al., 2014), i ratti estrogenizzati alla nascita non hanno un ciclo estrale regolare in età adulta, ma si trovano perennemente in una fase che può essere definita "simil-estro".

Il trattamento alla nascita con estradiolo induce un aumento nell'espressione della subunità $\alpha 4$ rispetto al gruppo di controllo in proestro (+46%, $p < 0.05$) mentre nessuna differenza significativa si osserva rispetto al gruppo di controllo in diestro 1 (Figura 11c). È stato anche riscontrato un aumento significativo nell'espressione della subunità δ del recettore GABA_A nei ratti estrogenizzati alla nascita rispetto al gruppo di controllo in proestro (+30%, $p < 0.05$; Figura 11d). Inoltre, è stato osservato un aumento significativo dell'espressione della subunità δ anche nei ratti di controllo in diestro 1 rispetto a quelli in proestro (+33%, $p < 0.05$; Figura 11d). Infine, non è stata riscontrata nessuna differenza significativa nell'espressione delle subunità $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\gamma 2$ nella frazione extrasinaptica di membrane ippocampali di ratti trattati alla nascita con estradiolo rispetto a ratti di controllo sia in proestro che in diestro 1 (Figure 11a, 11b, 11e).

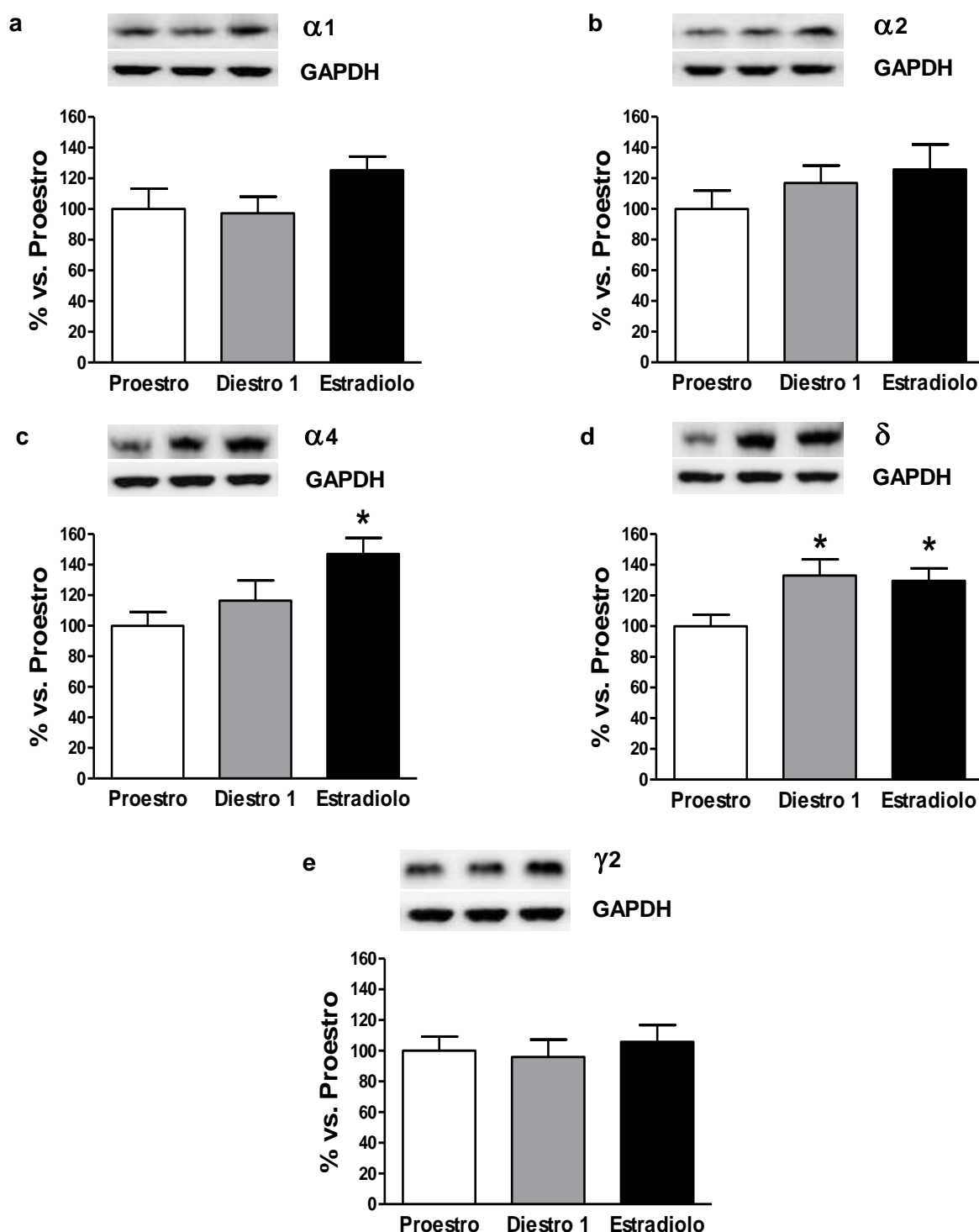


Figura 11. Il trattamento neonatale con estradiolo aumenta i livelli proteici delle subunità $\alpha 4$ e δ del recettore $GABA_A$ nella frazione extrasinaptica dell'ippocampo di ratti femmina adulti. Gli animali sono stati trattati entro 24 ore dalla nascita con estradiolo benzoato (10 $\mu\text{g}/50$ μl /ratto, s.c.) e sacrificati a 60-90 giorni d'età. Gli animali di controllo hanno ricevuto un ugual volume di solvente. I dati sono espressi come percentuale di variazione rispetto al valore del gruppo di controllo in proestro e rappresentano la media \pm SEM di 12 animali per gruppo. Le immagini sopra ogni grafico sono le bande rappresentative degli immunoblot per ciascuna subunità e per la proteina di riferimento GAPDH.

* $p < 0.05$ vs. gli animali di controllo in proestro.

Per valutare se le modificazioni dell'espressione delle subunità $\alpha 4$ e δ del recettore $GABA_A$, indotte dal trattamento neonatale con estradiolo, fossero correlate alle fluttuazioni nei livelli di allopregnanolone, le concentrazioni di questo steroide neuroattivo sono state misurate nel plasma degli stessi animali i cui ippocampi sono stati utilizzati per analizzare l'espressione delle subunità dei recettori $GABA_A$. Le concentrazioni di allopregnanolone sono più elevate nel plasma dei ratti di controllo in diestro 1 rispetto ai ratti di controllo in proestro (+30%, $p < 0.05$; Figura 12). Il trattamento neonatale con estradiolo induce una riduzione dei livelli plasmatici di allopregnanolone sia rispetto ai ratti di controllo in proestro (-69%, $p < 0.001$), sia rispetto ai ratti di controllo in diestro 1 (-76%, $p < 0.001$; Figura 12).

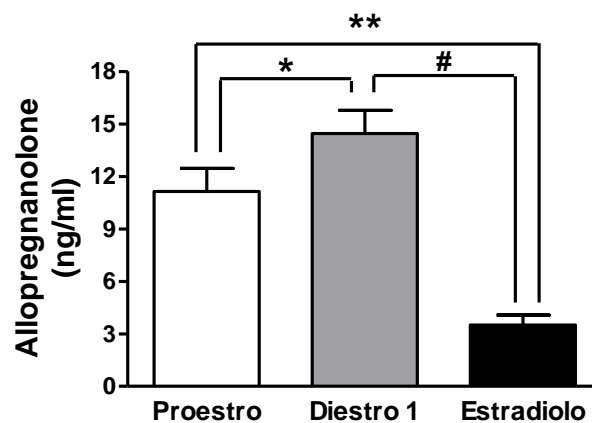


Figura 12. Il trattamento neonatale con estradiolo induce una riduzione dei livelli plasmatici di allopregnanolone in età adulta rispetto ai ratti di controllo in proestro e in diestro 1. Gli animali sono stati trattati entro 24 ore dalla nascita con estradiolo benzoato (10 $\mu g/50 \mu l$ /ratto, s.c.) e sacrificati a 60-90 giorni d'età. Gli animali di controllo hanno ricevuto un ugual volume di solvente. I dati sono espressi in nanogrammi di steroide per ml di plasma e rappresentano la media \pm SEM di 12 animali per gruppo.

* $p < 0.05$ e ** $p < 0.001$ vs. gli animali di controllo in proestro; # $p < 0.001$ vs. gli animali di controllo in diestro 1.

In letteratura, questa rappresenta la prima evidenza secondo cui l'esposizione ad estrogeni in età perinatale è in grado di alterare l'espressione dei recettori extrasinaptici $GABA_A$ nel cervello di ratti femmina adulti.

I livelli cerebrali di allopregnanolone sono soggetti a dinamiche fluttuazioni nel corso dello sviluppo, con concentrazioni massime in corrispondenza della seconda settimana di vita (Grobin & Morrow, 2001), per poi declinare con l'inizio della pubertà (Shen et al., 2007). Inoltre, le variazioni dei livelli di allopregnanolone riscontrate durante lo sviluppo sono in

grado di influenzare sia i comportamenti associati alla sfera affettiva e cognitiva, sia l'espressione delle subunità dei recettori GABA_A in età adulta (Shen et al., 2007; Calza et al., 2010; Shen et al., 2010; Berretti et al., 2014; Darbra et al., 2014). Dal momento che la riduzione delle concentrazioni cerebrali di allopregnanolone, indotta dal trattamento con estradiolo, si instaura prima dell'inizio della pubertà (21° giorno di vita), per poi permanere in età adulta (Calza et al., 2010; Berretti et al., 2014), si può ipotizzare che il trattamento neonatale con estradiolo alteri le fluttuazioni dei livelli di allopregnanolone caratteristiche del periodo dello sviluppo e di conseguenza induca effetti a lungo termine sulla plasticità dei recettori GABA_A che si mantengono nell'età adulta. In accordo con questa ipotesi, l'aumentata espressione dei recettori GABA_A $\alpha 4/\delta$, osservata nei ratti trattati alla nascita con estradiolo rispetto ai ratti di controllo in proestro, potrebbe non essere causata direttamente dalle basse concentrazioni di allopregnanolone nell'ippocampo dei ratti adulti, ma potrebbe essere il risultato degli effetti a lungo termine indotti dalle basse concentrazioni di allopregnanolone instauratesi nelle fasi precoci dello sviluppo. Infatti, mentre le modificazioni dell'espressione della subunità δ che avvengono fisiologicamente con l'alternarsi delle fasi del ciclo estrale sono correlate con le fluttuazioni dei livelli circolanti di allopregnanolone (più alti durante la fase di diestro 1 e più bassi durante la fase di proestro), nei ratti femmina trattati alla nascita con estradiolo l'espressione della subunità δ aumenta in maniera del tutto simile ai ratti di controllo in diestro 1, nonostante i livelli di allopregnanolone siano diametralmente opposti rispetto a quelli riscontrati nei ratti in questa fase del ciclo (Figura 12). Inoltre, il risultato che nei ratti femmina trattati con estradiolo l'aumento dell'espressione della subunità δ è associata a quella della subunità $\alpha 4$, la quale non sembra essere influenzata dalle fluttuazioni di allopregnanolone caratteristiche del ciclo estrale (Maguire et al., 2005; Figura 11c), supporta l'ipotesi secondo cui le concentrazioni di allopregnanolone al momento del sacrificio non sono di per sé direttamente responsabili delle alterazioni dell'espressione delle subunità $\alpha 4/\delta$ del recettore GABA_A. Questa conclusione è in contrasto con precedenti evidenze sperimentali che hanno dimostrato che l'espressione dei recettori GABA_A a livello dell'ippocampo è correlata con variazioni rapide e transienti dei livelli di allopregnanolone durante le varie fasi del ciclo estrale (Maguire et al., 2005; Maguire & Mody, 2007), gravidanza e post-parto (Concas et al., 1998; Maguire & Mody, 2008; Sanna et al., 2009), e in seguito ad astinenza da progesterone (Smith et al., 1998b). Questi risultati quindi suggeriscono che l'aumento dell'espressione delle subunità $\alpha 4/\delta$ a livello extrasinaptico, indotto dal

trattamento neonatale con estradiolo, potrebbe rappresentare un meccanismo compensatorio messo in atto al fine di contrastare la persistente riduzione dei livelli ippocampali di allopregnanolone. In accordo con questo risultato, l'aumentata espressione delle subunità extrasinaptiche $\alpha 4/\delta$, indotta dall'esposizione neonatale con estradiolo, è coerente sia con l'aumentata espressione di questi stessi recettori GABA_A nell'ippocampo di ratti sottoposti ad isolamento sociale, i quali mostrano un'analogia diminuzione dei livelli cerebrali e plasmatici di allopregnanolone (Serra et al., 2007), sia con le osservazioni ottenute durante la pubertà, in cui si ha la diminuzione dei livelli di questo steroide neuroattivo (Shen et al., 2007).

È noto dalla letteratura che modificazioni nell'espressione delle subunità dei recettori GABA_A extrasinaptici sono associate ad alterazioni delle correnti toniche GABAergiche in diversi modelli animali (Maguire et al., 2005; Maguire & Mody, 2007; Serra et al., 2007; Shen et al., 2007; Sanna et al., 2009; Sanna et al., 2011; Sarkar et al., 2011; Carver et al., 2014). In collaborazione con il laboratorio del Prof. Enrico Sanna del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università degli Studi di Cagliari, è stato quindi valutato se il trattamento neonatale con estradiolo fosse in grado di alterare la trasmissione GABAergica nelle cellule granulari del giro dentato dell'ippocampo di ratti femmina adulti. I neuroni granulari del giro dentato dell'ippocampo sono stati sottoposti a voltage clamp (-65 mV) mediante l'utilizzo di pipette da patch contenenti una soluzione interna ad elevata concentrazione di ioni Cl⁻ al fine di innalzare il potenziale di equilibrio dello ione Cl⁻ a 0 mV. Sotto queste condizioni di registrazione, l'attivazione dei recettori GABAergici genera delle correnti in entrata che riflettono una fuoriuscita di ioni Cl⁻. Le correnti GABAergiche sono state inoltre isolate farmacologicamente mediante l'aggiunta alla soluzione di ACSF di acido chinurenico (1 mM), un antagonista ad ampio spettro dei recettori glutammatergici. Dopo una registrazione basale della durata di circa 3 minuti, le fettine sono state esposte all'agonista dei recettori GABA_A THIP (3 μ M) per 5 minuti al fine di attivare preferenzialmente i recettori GABA_A extrasinaptici per i quali il THIP presenta un'alta affinità. Questo passaggio termina con la co-applicazione di THIP e bicucullina (20 μ M) al fine di sopprimere tutte le correnti GABAergiche. I risultati ottenuti mostrano differenze significative nell'azione modulatoria del THIP sulla holding current (Figura 13a). In particolare, il THIP induce uno shift maggiore nella holding current misurata negli animali di controllo in fase di diestro 1 ($p < 0.01$) e negli animali trattati alla nascita con estradiolo ($p < 0.001$), rispetto agli animali di controllo in fase di proestro

(Figura 13b); inoltre il THIP aumenta la variazione nella holding current con una percentuale maggiore negli animali di controllo in diestro 1 ($p<0.05$) e negli animali trattati alla nascita con estradiolo ($p<0.01$), rispetto agli animali di controllo in proestro (Figura 13c). Questi risultati dimostrano quindi che l'aumentata espressione delle subunità $\alpha 4$ e δ del recettore GABA_A nell'ippocampo di ratti femmina trattati alla nascita con estradiolo è associata a un incremento dell'azione modulatoria dell'agonista THIP sulle correnti toniche GABAergiche misurate a livello delle cellule granulari del giro dentato.

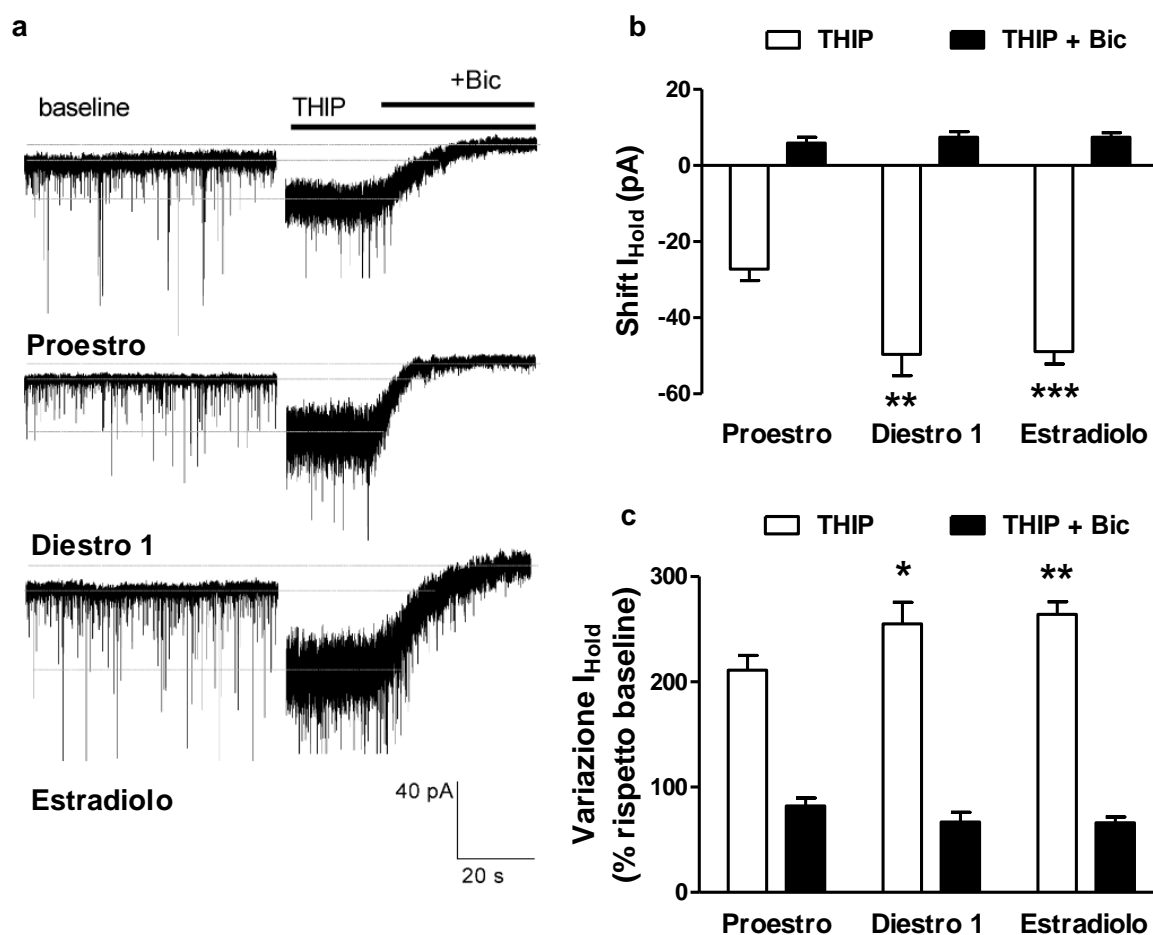


Figura 13. Il trattamento neonatale con estradiolo altera le correnti toniche GABAergiche nelle cellule granulari del giro dentato di ratti femmina adulti. Gli animali sono stati trattati entro 24 ore dalla nascita con estradiolo benzoato (10 μ g/50 μ l/ratto, s.c.) e sacrificati a 60-90 giorni d'età. Gli animali di controllo hanno ricevuto un ugual volume di solvente. a) Tracciati rappresentativi delle correnti toniche registrate in modalità whole-cell voltage clamp (-65 mV) da singole cellule granulari del giro dentato di ciascuno dei gruppi sperimentali. Dopo un periodo basale di circa 3 minuti, l'applicazione di THIP (3 μ M) ha prodotto uno shift negativo e un aumento della variazione nella holding current. Tutte le correnti GABAergiche sono state in seguito completamente sopresse mediante l'applicazione di bicucullina (20 μ M). (b e c) Grafici rappresentanti l'effetto indotto dall'applicazione di THIP sullo shift (b) e sulla variazione (c) della holding current in linea con quello mostrato in (a). I dati rappresentano la media \pm SEM di 14-27 neuroni.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$ vs. gli animali di controllo in proestro.

I recettori extrasinaptici aventi nella loro composizione le subunità $\alpha 4/\delta$ rappresentano il principale bersaglio dell'allopregnanolone; infatti, questo neurosteroido, andando ad agire a livello di questi specifici recettori, è in grado di controllare l'eccitabilità neuronale attraverso la modulazione della componente tonica della corrente inibitoria GABA_Aergica. L'incremento della corrente tonica, osservato nei ratti femmina estrogenizzati alla nascita, è del tutto comparabile a quello osservato nei ratti di controllo in diestro 1, nonostante la differente concentrazione plasmatica di allopregnanolone riscontrata tra questi due gruppi sperimentali (marcatamente più bassa nei ratti trattati alla nascita con estradiolo rispetto ai ratti in diestro 1). Questo risultato suggerisce che l'aumentata corrente tonica inibitoria osservata nei ratti estrogenizzati alla nascita, potrebbe essere indipendente dai livelli ambientali di allopregnanolone e supporta l'ipotesi che le modificazioni nella struttura e nella funzione dei recettori GABA_A, indotte dal trattamento neonatale con estradiolo, potrebbero rappresentare una condizione che si instaura già nelle prime fasi della vita dell'animale, contesto del tutto differente dalle rapide alterazioni che si instaurano durante condizioni fisiologiche tra cui proprio l'alternarsi delle fasi del ciclo ovarico. Quindi, l'aumentata corrente tonica osservata nei ratti femmina adulti trattati alla nascita con estradiolo potrebbe essere causata dall'aumentata espressione dei recettori GABA_A extrasinaptici $\alpha 4/\delta$ nel giro dentato dell'ippocampo, e potrebbe essere necessaria per bilanciare la persistente riduzione dei livelli di allopregnanolone indotta da questo trattamento.

Effetto del trattamento neonatale con estradiolo sull'espressione e la funzione dei recettori GABA_A nella frazione sinaptica dell'ippocampo di ratti femmina adulti

È stato dimostrato che fluttuazioni dei livelli di allopregnanolone sono in grado di indurre anche alterazioni nell'espressione di quelle subunità che principalmente (anche se non esclusivamente) compongono i recettori GABA_A localizzati a livello sinaptico (Concas et al., 1998; Follesa et al., 2002; Maguire et al., 2005; Porcu et al., 2012). È stato quindi valutato se il trattamento neonatale con estradiolo fosse in grado di alterare l'espressione dei recettori GABA_A nella frazione sinaptica di membrane di ippocampo di ratti femmina adulti. Il trattamento neonatale con estradiolo induce una riduzione significativa dell'espressione della subunità $\alpha 1$ a livello sinaptico (-36%, $p < 0.05$) rispetto al gruppo di controllo in fase di proestro, mentre non si ha nessuna variazione significativa rispetto al

gruppo di controllo in fase di diestro 1 (Figura 14a). Analogamente, l'espressione della subunità $\alpha 4$ a livello sinaptico è ridotta nei ratti estrogenizzati alla nascita (-32%, $p < 0.05$) rispetto al gruppo di controllo in proestro, mentre non si ha nessuna variazione significativa tra le femmine estrogenizzate e il gruppo di controllo in fase di diestro 1 (Figura 14c). Il trattamento neonatale con estradiolo diminuisce anche l'espressione della subunità $\gamma 2$ (-36%, $p < 0.05$) rispetto ai ratti di controllo in fase di proestro (Figura 14e); inoltre, l'espressione di questa subunità è significativamente ridotta anche nel gruppo di controllo in diestro 1 (-25%, $p < 0.05$) rispetto al gruppo di controllo in proestro (Figura 14e). Infine, l'espressione della subunità $\alpha 2$ a livello sinaptico non si modifica nelle femmine estrogenizzate rispetto ai ratti di controllo sia in proestro sia in diestro 1 (Figura 14b). In accordo con le evidenze presenti in letteratura (Carver & Reddy, 2013), non è stato ottenuto nessun segnale per quanto riguarda la subunità δ a livello sinaptico, essendo questa una proteina espressa esclusivamente a livello extrasinaptico (Figura 14d).

Dal momento che il trattamento neonatale con estradiolo induce una riduzione dei livelli proteici dei recettori GABA_A a livello della frazione sinaptica di ippocampo, sempre in collaborazione con il laboratorio del Prof. Enrico Sanna è stata valutata la presenza di eventuali modificazioni a livello delle correnti fasiche GABAergiche. Le correnti fasiche GABAergiche spontanee (sIPSCs) sono state registrate in un periodo di 3 minuti in cellule granulari del giro dentato dell'ippocampo di ratti femmina adulti (Figura 15a). Le analisi delle caratteristiche cinetiche delle sIPSCs hanno rivelato delle modificazioni nel tempo di decadimento, il quale è risultato ridotto negli animali estrogenizzati alla nascita rispetto agli animali di controllo sia in diestro 1 che in proestro ($p < 0.05$; Figura 15c). È stato inoltre osservato un marcato aumento nella frequenza delle sIPSCs sia negli animali trattati alla nascita con estradiolo ($p < 0.01$) che negli animali di controllo in diestro 1 ($p < 0.05$) rispetto agli animali di controllo in proestro (Figura 15d). Al contrario, l'ampiezza delle sIPSCs non ha mostrato differenze nelle femmine estrogenizzate rispetto ai ratti di controllo sia in proestro sia in diestro 1 (Figura 15b). Infine, in accordo con precedenti evidenze sperimentali (Maguire et al., 2005) non sono state osservate differenze nell'ampiezza e nel tempo di decadimento delle sIPSCs durante le fasi del ciclo estrale (Figura 15b e 15d).

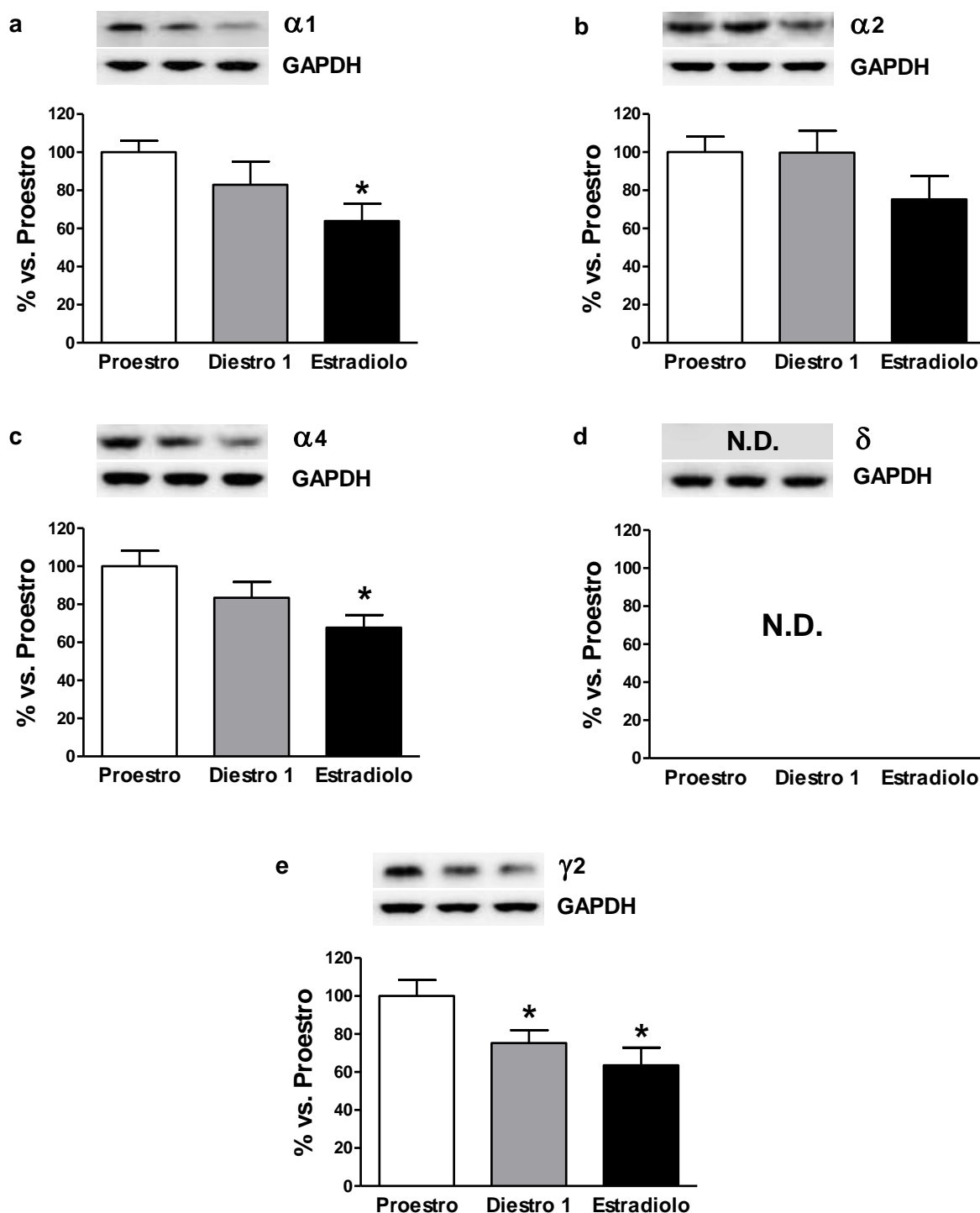


Figura 14. Il trattamento neonatale con estradiolo riduce i livelli proteici delle subunità $\alpha 1$, $\alpha 4$ e $\gamma 2$ del recettore $GABA_A$ nella frazione sinaptica dell'ippocampo di ratti femmina adulti. Gli animali sono stati trattati entro 24 ore dalla nascita con estradiolo benzoato (10 $\mu g/50 \mu l$ /ratto, s.c.) e sacrificati a 60-90 giorni d'età. Gli animali di controllo hanno ricevuto un ugual volume di solvente. I dati sono espressi come percentuale di variazione rispetto al valore del gruppo di controllo in proestro e rappresentano la media \pm SEM di 12 animali per gruppo. Le immagini sopra ogni grafico sono le bande rappresentative degli immunoblot per ciascuna subunità e per la proteina di riferimento GAPDH.

* $p < 0.05$ vs. gli animali di controllo in proestro.

Nel complesso, questi risultati dimostrano che il trattamento neonatale con estradiolo riduce l'espressione dei recettori sinaptici che contengono le subunità $\alpha 1$, $\alpha 4$ e $\gamma 2$ nell'ippocampo di ratto femmina adulto, effetto che sembra non essere correlato direttamente ai livelli ippocampali di allopregnanolone. Infatti, i ratti femmina adulti estrogenizzati alla nascita mostrano una riduzione significativa dell'espressione della subunità $\gamma 2$ così come i ratti di controllo in diestro 1, rispetto ai ratti di controllo in proestro, nonostante questi due gruppi sperimentali abbiano livelli ippocampali di allopregnanolone opposti. In accordo con tale evidenza, l'espressione delle subunità $\alpha 1$ e $\alpha 4$ nella frazione sinaptica dell'ippocampo di ratti femmina adulti non varia durante le fasi del ciclo estrale, mentre è significativamente ridotta nei ratti estrogenizzati alla nascita.

In contrasto con questi risultati, è stato precedentemente dimostrato che il trattamento neonatale con estradiolo è in grado di aumentare l'espressione delle subunità $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\gamma 2$ nella corteccia cerebrale di ratti femmina adulti, senza alterare l'espressione di altre subunità del recettore GABA_A (Calza et al., 2010). Questa discrepanza potrebbe essere spiegata dalla differente preparazione di membrane utilizzata per analizzare i livelli delle subunità (la frazione P2 rispetto alle frazioni sinaptica ed extrasinaptica). Inoltre, non si può escludere che la differente espressione delle diverse subunità del recettore GABA_A nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo possa essere dovuta a una diversa sensibilità di queste aree alla somministrazione neonatale di estrogeno. Questa conclusione è in accordo con l'evidenza che le concentrazioni di estradiolo alla nascita sono più elevate nell'ippocampo rispetto alla corteccia cerebrale nel cervello di ratti femmina (Amateau et al., 2004). Inoltre, sono stati evidenziati differenti meccanismi molecolari nell'ippocampo rispetto alla corteccia alla base dei processi di organizzazione regionale indotti dall'estradiolo durante lo sviluppo cerebrale (Amateau & McCarthy, 2004).

Questi risultati dimostrano che il trattamento neonatale con estradiolo modifica anche le correnti fasiche spontanee (sIPSCs) mediate dal GABA, registrate a livello delle cellule granulari del giro dentato di ratti femmina adulti, rispetto ai ratti di controllo sia in diestro 1 sia in proestro. Tali modifiche potrebbero dipendere dalla diminuzione, indotta dal trattamento con estradiolo, dell'espressione dei recettori sinaptici GABA_A aventi nella loro composizione le subunità $\alpha 1$, $\alpha 4$ e $\gamma 2$. Questo trattamento è anche associato ad un aumento della frequenza delle sIPSCs mediate dai recettori sinaptici GABA_A a livello delle cellule granulari del giro dentato dell'ippocampo, effetto che potrebbe essere correlato all'aumento della probabilità del rilascio presinaptico di GABA da parte dei neuroni presinaptici. In

accordo con tale ipotesi, esistono evidenze in letteratura attestanti che l'esposizione ormonale nel giorno della nascita porta ad un aumento dei livelli di GABA in diverse aree cerebrali (Davis et al., 1999).

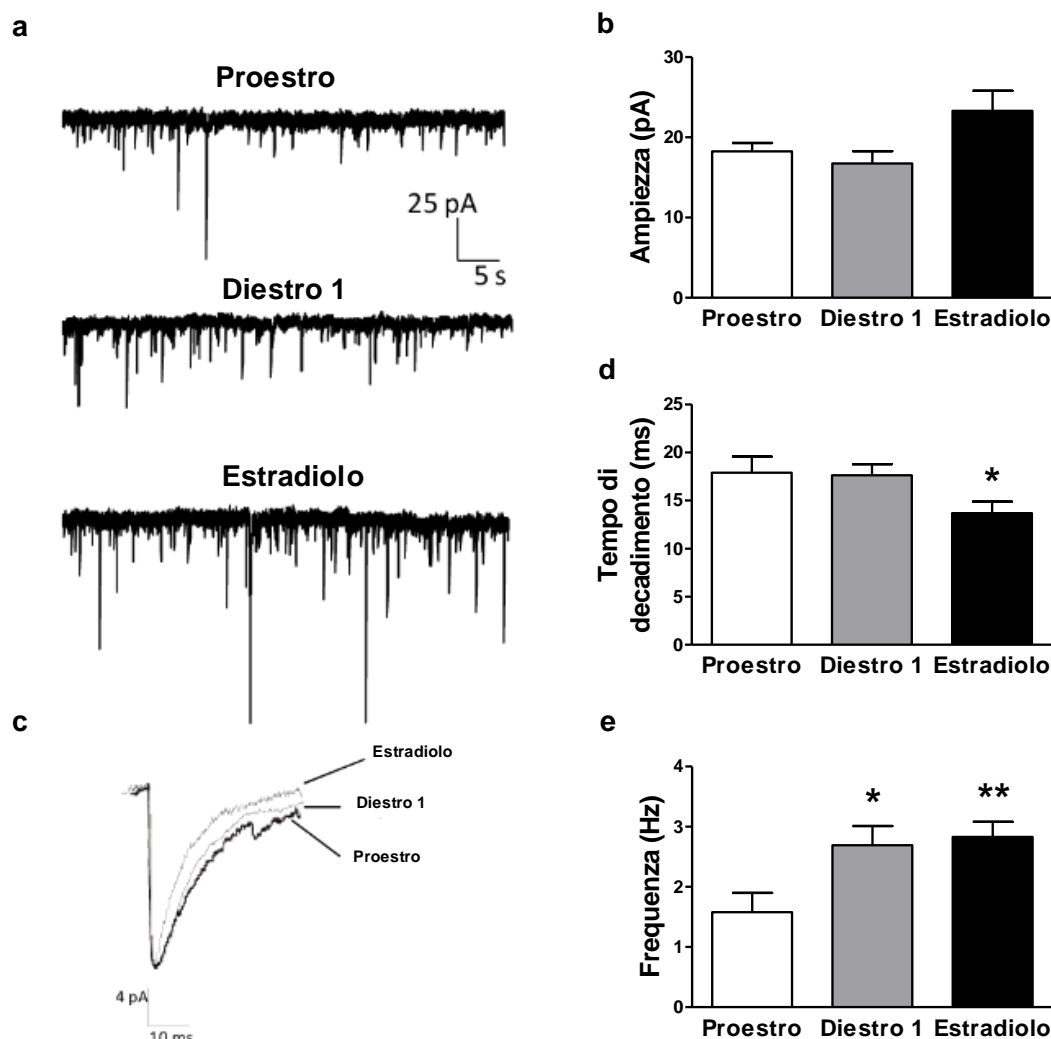


Figura 15. Il trattamento neonatale con estradiolo altera le correnti fasiche GABAergiche nelle cellule granulari del giro dentato di ratti femmina adulti. Gli animali sono stati trattati entro 24 ore dalla nascita con estradiolo benzoato (10 μ g/50 μ l/ratto, s.c.) e sacrificati a 60-90 giorni d'età. Gli animali di controllo hanno ricevuto un ugual volume di solvente. a) Tracciati rappresentativi delle correnti sIPSCs registrate in modalità whole-cell voltage clamp (-65 mV) da singole cellule granulari del giro dentato di ciascuno dei gruppi sperimentali. (b) Grafici rappresentanti le modificazioni dell'ampiezza delle sIPSCs. (c) Media normalizzata della sIPSC di ciascun gruppo sperimentale rappresentante la riduzione significativa del tempo di decadimento nel gruppo di ratti trattati alla nascita con estradiolo rispetto ai ratti appartenenti al gruppo di controllo in proestro e in diestro 1. (d) Grafici rappresentanti le modificazioni del tempo di decadimento delle sIPSCs. (e) Grafici rappresentanti le modificazioni della frequenza delle sIPSCs. I dati rappresentano la media \pm SEM di 8-22 neuroni.

* $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ vs. gli animali di controllo in proestro.

La diminuzione dell'espressione delle subunità $\alpha 1$, $\alpha 4$ e $\gamma 2$ nella frazione sinaptica e l'aumentata espressione delle subunità $\alpha 4/\delta$ nella frazione extrasinaptica, insieme alle corrispondenti modificazioni delle correnti fasica e tonica, osservate nei ratti adulti estrogenizzati alla nascita, potrebbe suggerire una regolazione complementare nell'espressione dei recettori GABA_A extrasinaptici e sinaptici. Uno switch di questo tipo è stato descritto anche per quanto riguarda l'espressione a livello ippocampale delle subunità δ e $\gamma 2$ sia durante il ciclo estrale che durante la gravidanza (Maguire et al., 2005; Sanna et al., 2009). Inoltre, è stato dimostrato che topi knockout per la subunità δ mostrano un aumento dell'espressione della subunità $\gamma 2$ (Peng et al., 2002). Ancora, sono state evidenziate alterazioni complementari nell'espressione di recettori GABA_A sinaptici ed extrasinaptici nel cervello di ratto in seguito a somministrazione di alte dosi di etanolo (Liang et al., 2007). Pertanto è probabile che l'aumentata espressione dei recettori extrasinaptici aventi nella loro composizione la subunità δ , osservata in seguito a trattamento con estradiolo, potrebbe essere compensata dalla parallela riduzione dell'espressione dei recettori sinaptici aventi nella loro composizione la subunità $\gamma 2$. In accordo con quest'ipotesi, una regolazione dinamica della composizione e della localizzazione dei recettori GABA_A tra frazione sinaptica ed extrasinaptica è stata evidenziata a livello dell'ippocampo (Jacob et al., 2008). Il meccanismo mediante il quale i neuroni facilitano l'accumulo dei recettori GABA_A a livello sinaptico o extrasinaptico non è ancora stato chiarito. È stato dimostrato che i recettori sinaptici, caratterizzati dalla subunità γ , e quelli extrasinaptici, caratterizzati dalla subunità δ , possono essere soggetti ad un "trafficking" continuo a livello della membrana cellulare caratterizzato da uno scambio tra i diversi tipi di recettori che consiste, probabilmente, in una sostituzione delle subunità che lo compongono (Thomas et al., 2005). I recettori sinaptici sarebbero reclutati direttamente dai loro omologhi extrasinaptici, inseriti precedentemente nella membrana plasmatica (Bogdanov et al., 2006; Jacob et al., 2008). Più di recente, è stato dimostrato che gli steroidi neuroattivi sono implicati nei meccanismi di fosforilazione che regolano il "trafficking" dei recettori nella membrana (Abramian et al., 2014). In definitiva, si potrebbe ipotizzare che l'aumentata espressione dei recettori $\alpha 4/\delta$ e la riduzione dei recettori $\alpha 1/\alpha 4/\gamma 2$ possano indicare un alterato scambio tra recettori extrasinaptici e sinaptici, dovuto alla diminuzione delle concentrazioni cerebrali di allopregnanolone indotta dal trattamento neonatale con estradiolo.

D'altra parte, la possibilità che l'estradiolo, indipendentemente dai livelli di allopregnanolone, possa direttamente indurre un'alterazione dell'espressione di specifiche subunità del recettore GABA_A a livello dell'ippocampo, a partire dalle prime fasi dello sviluppo per poi permanere fino all'età adulta, non può essere certamente esclusa. Infatti, l'estrogeno è in grado di regolare l'espressione dei recettori GABA_A sia in vivo (Herbison & Fénelon, 1995) che in vitro (Pierson et al., 2005). Inoltre, è stato dimostrato che sia le correnti toniche che quelle fasiche GABAergiche registrate a livello dei neuroni ippocampali durante lo sviluppo sono alterate dal trattamento con 17 β -estradiolo, sebbene tale effetto sia circoscritto ai primi stadi di sviluppo (Wojtowicz et al., 2008).

CAPITOLO 2

Effetto della somministrazione neonatale di estradiolo sulla sensibilità allo stress nel ratto adulto

Il mantenimento dello stato di omeostasi in seguito a stimoli ambientali e fisiologici è indispensabile per la sopravvivenza di un organismo vivente e l'abilità di adattarsi è mediata da tutta una serie di sistemi altamente interconnessi e conservati dal punto di vista filogenetico (Gunn et al., 2015). L'ipotalamo, e in particolare il nucleo paraventricolare (PVN), è una regione cerebrale fondamentale nell'avvio della risposta autonoma e neuroendocrina che avviene in seguito all'esposizione ad uno stimolo stressante (Herman & Cullinan, 1997). In seguito a stress, i neuroni parvocellulari del PVN che proiettano a livello spinale (localizzati nella regione dorsale e ventromediale) modulano rapidamente le risposte autonome, mentre i neuroni parvocellulari implicati nella risposta neuroendocrina (localizzati nella regione dorsomediale) proiettano a livello dell'eminenza mediana e danno inizio all'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (IIS) mediante la produzione dell'ormone di rilascio della corticotropina (CRH), il quale a sua volta stimola la produzione di adrenocorticotropina (ACTH) da parte dell'ipofisi e il rilascio di corticosterone e di steroidi neuroattivi da parte del surrene (Ulrich-Lai & Herman, 2009; Porcu & Morrow, 2014).

Gli steroidi neuroattivi e l'allopregnanolone in particolare, svolgono un ruolo importante nella risposta allo stress, regolando l'attività dell'asse IIS, ma anche del sistema monoaminergico, attraverso la modulazione della trasmissione GABAergica (Biggio et al., 2007; Ulrich-Lai & Herman, 2009). Infatti, il GABA, a livello dell'ipotalamo, agendo sui recettori GABA_A presenti sui neuroni parvocellulari del PVN che liberano CRH, esercita un tono inibitorio sulla liberazione di CRH e di conseguenza sulla cascata di attivazione dell'asse IIS. Lo stress acuto induce una rapida diminuzione della trasmissione GABAergica con conseguente attivazione dell'asse IIS e aumento delle concentrazioni cerebrali e plasmatiche di allopregnanolone (Purdy et al., 1991; Barbaccia et al., 1994; Barbaccia et al., 1996a; Barbaccia et al., 1996b; Barbaccia et al., 1997). L'aumento delle concentrazioni cerebrali di allopregnanolone, che si verifica circa 30 minuti dopo l'evento stressante, potrebbe rappresentare un meccanismo omeostatico per ripristinare l'inibizione

del tono GABAergico nei neuroni ipotalamici e quindi ridurre la risposta neuroendocrina allo stress (Biggio et al., 2007).

La risposta allo stress è una risposta complessa che, oltre a perturbare l'attività dei neuroni ipotalamici, influenza diversi circuiti cerebrali tra cui il sistema limbico che include amigdala, ippocampo e corteccia prefrontale. In particolare, l'ippocampo e la corteccia prefrontale presentano un'elevata densità di recettori per i glucocorticoidi (GR) e sono implicati nella regolazione del feedback negativo in seguito a stress (Jacobson & Sapolsky, 1991; Diorio et al., 1993; Ulrich-Lai & Herman, 2009). La corteccia prefrontale svolge anche un ruolo importante nell'iniziare la risposta allo stress sia a livello periferico che centrale e lo stress aumenta marcatamente le concentrazioni di dopamina in quest'area (Finlay et al., 1995; Ulrich-Lai & Herman, 2009). È interessante notare che la somministrazione di allopregnanolone attenua l'aumento di monoamine indotto dallo stress nella corteccia prefrontale (Motzo et al., 1996), mentre la riduzione delle concentrazioni di allopregnanolone potenzia l'effetto dello stress sui neuroni monoaminergici mesocorticali (Dazzi et al., 2002). Pertanto, l'allopregnanolone ripristina l'omeostasi riducendo la risposta neuroendocrina e monoaminergica allo stress.

Obiettivo

Considerato il ruolo dell'allopregnanolone nella modulazione della risposta allo stress acuto (Owens et al., 1992; Barbaccia et al., 1994; Barbaccia et al., 1996a; Patchev et al., 1996; Barbaccia et al., 1997), e l'evidenza che alterazioni delle concentrazioni cerebrali di steroidi neuroattivi, influenzano la regolazione dell'asse IIS e la sensibilità allo stress (Biggio et al., 2007; Biggio et al., 2014; Porcu & Morrow, 2014), l'obiettivo è stato quello di valutare se la marcata riduzione dei livelli cerebrali di allopregnanolone, indotta dal trattamento neonatale con estradiolo, fosse in grado di alterare la sensibilità allo stress acuto in ratti femmina adulti.

Metodi

Animali e trattamento neonatale con estradiolo benzoato

Per gli esperimenti sono stati utilizzati ratti femmina Sprague-Dawley adulti, trattati con estradiolo benzoato il giorno della nascita, come descritto nel Capitolo 1, pagine 16-17.

Foot-shock stress

L'apparecchio del foot-shock (Lafayette Instruments) è costituito da una gabbia in plexiglass, delle dimensioni di 28 x 22 x 27 cm con due pareti opache, e da uno stimolatore collegato al pavimento della gabbia; quest'ultimo è costituito da una serie di sbarre in ottone le quali sono collegate allo stimolatore in modo che la polarità elettrica di due sbarre adiacenti sia inversa. Gli animali sono stati sottoposti ad una leggera scarica elettrica (ampiezza 0.2 mA, durata 500 ms) ogni secondo per 8 minuti e sono stati sacrificati secondo i tempi indicati.

Trattamento con desametasone

Il desametasone (Sigma-Aldrich) è stato sciolto in 600 µl di etanolo assoluto per ogni 5 mg di farmaco e portato a volume con soluzione fisiologica. Il desametasone è stato somministrato in peritoneo (i.p.) alla dose di 500 µg/kg/1 ml. Gli animali di controllo hanno ricevuto un uguale volume di solvente. Gli animali sono stati sacrificati 150 minuti dopo l'iniezione del farmaco o del solvente.

Trattamento con progesterone

Il progesterone (1 mg/kg/1 ml, Sigma-Aldrich), sciolto in olio di sesamo mediante ultrasuoni per 2 ore, è stato iniettato sottocute due volte al giorno (ore 8:00 e ore 20:00) per cinque giorni (Dazzi et al., 2002). Gli animali di controllo hanno ricevuto un ugual volume di solvente. Questo trattamento induce un aumento delle concentrazioni cerebrocorticali di allopregnanolone (Dazzi et al., 2002). Il giorno successivo a quello dell'ultima somministrazione di progesterone, gli animali sono stati sottoposti al foot-shock stress per

valutare l'effetto del ripristino delle concentrazioni cerebrali di allopregnanolone sulla risposta dopaminergica allo stress; un altro gruppo di animali è stato sottoposto al test del hot plate per valutare un'eventuale azione nocicettiva del progesterone.

Estrazione e misurazione degli steroidi cerebrali e plasmatici mediante dosaggio radioimmunologico (RIA)

Gli steroidi neuroattivi sono stati estratti e misurati come descritto nel Capitolo 1, pagine 19-20.

Per quanto riguarda la fase di estrazione, gli steroidi presenti nell'omogenato di corteccia cerebrale (400 mg di tessuto in 4 ml di tampone fosfato) e di ipotalamo (50 mg di tessuto in 300 µl di tampone fosfato) di ogni singolo ratto, sono stati estratti quattro volte con un ugual volume di acetato di etile.

I livelli di corticosterone sono stati misurati mediante dosaggio radioimmunologico con un anticorpo specifico (MP Biomedicals), ed il relativo steroide triziato (Perkin Elmer, circa 8000 cpm) (Porcu et al., 2014).

Preparazione dei lisati cellulari e Western blot

La preparazione dei lisati cellulari per la determinazione dei recettori per i glucocorticoidi (GR) e mineralocorticoidi (MR) è stata effettuata secondo protocolli già presenti in letteratura (Pisu et al., 2011). Gli ipotalami e gli ippocampi sono stati rapidamente estratti dal cervello degli animali sacrificati (<1 minuto), sono stati omogenati in tampone di lisi (EDTA 0.5 M, Tris-HCl 1 M, Triton X-100 1%, NP-40 1%, PMSF 0.1 mM, Benzamidina 1 mM, Apotininina 1 ml/L, Bacitracina 200 mg/L) manualmente mediante l'utilizzo di un pestello in teflon seguito dall'impiego del sonicatore a ultrasuoni VCX 130PB (Sonics & Materials; un ciclo da 30 secondi a +4°C, ampiezza 20%), e infine conservati a -80°C fino all'uso. La concentrazione delle proteine è stata determinata mediante l'utilizzo del kit DC Protein Assay (Bio-Rad) che si basa sui principi del metodo di Lowry.

Un'uguale quantità di proteine totali (30 µg) è stata sottoposta al Western blot, come descritto nel Capitolo 1, pagine 20-21.

Per la misurazione dei livelli di GR e MR, le membrane sono state incubate overnight a +4°C con l'anticorpo primario specifico anti-GR e anti-MR, rispettivamente (Santa Cruz Biotechnology, 1:200).

Microdialisi cerebrale

Gli animali sono stati anestetizzati mediante iniezione di cloralio idrato (0.4 g/kg, i.p.) per consentire l'inserimento di una fibra concentrica da dialisi a livello della corteccia prefrontale mediale (A +3.2, ML +0.8, V -5.3 rispetto al bregma), in accordo con l'atlante Paxinos (Paxinos & Watson, 2007). La lunghezza attiva della membrana da dialisi (Hospal-Dasco) è stata limitata a 4 mm. Gli esperimenti sono stati eseguiti in ratti liberi di muoversi, 24 ore dopo l'impianto della fibra per permettere il recupero dall'operazione chirurgica. Il tampone di Ringer (KCl 3 mM, NaCl 125 mM, CaCl₂ 1.3 mM, MgCl₂ 1 mM, NaHCO₃ 23 mM, K₃PO₄ 1.5mM; pH 7.3) è stato iniettato attraverso la fibra da dialisi a flusso costante di 2 µl/min. I campioni di dializzato sono stati raccolti ogni 20 minuti e i livelli di dopamina sono stati misurati mediante HPLC (Dazzi et al., 1995). Alla media delle concentrazioni di dopamina degli ultimi tre campioni raccolti prima dell'esposizione al foot-shock stress è stato attribuito il valore di 100 (basale), e tutti i valori successivi sono stati espressi come variazione in percentuale rispetto al 100% del valore basale. La media del valore di recovery delle fibre è stata del $15 \pm 3\%$; tutte le fibre sono state testate prima dell'impianto, e quelle con un valore di recovery non compreso in tale range non sono state utilizzate. Il valore di concentrazione assoluta di dopamina non è stato corretto per questo parametro. Alla fine di ogni esperimento, la collocazione della fibra è stata verificata istologicamente. I dati ottenuti da tutti quei ratti nei quali la fibra è stata trovata fuori dalla regione cerebrale bersaglio, sono stati esclusi dall'analisi finale.

Hot plate test

Il test del hot plate è stato eseguito mediante l'utilizzo di una piastra (Ugo Basile) la cui temperatura è stata settata a $51 \pm 0.5^\circ\text{C}$. La piastra è circondata da un cilindro trasparente per evitare la fuga dell'animale. Il ratto viene messo sulla piastra calda, e viene misurata la latenza dell'animale al sollevamento o alla leccata di una o più zampe, come indice di dolore. Il tempo massimo di permanenza del ratto nel hot plate è comunque di 30 secondi.

Gli animali sono stati abituati alla stanza in cui si è svolto il test per almeno 30 minuti prima dell'inizio del test.

Analisi statistica

I dati riportati rappresentano la media \pm errore standard della media (SEM) e sono stati analizzati mediante il t-test di Student o l'analisi della varianza (ANOVA) a due vie, seguita dal post hoc test di Bonferroni. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati e discussione

Effetto del trattamento neonatale con estradiolo sulla sensibilità allo stress acuto e sull'espressione dei recettori GR e MR in ratti femmina adulti

La trasmissione GABAergica e gli steroidi neuroattivi giocano un ruolo chiave nella risposta allo stress e nell'omeostasi dell'asse IIS. Poiché il trattamento neonatale con estradiolo diminuisce le concentrazioni cerebrali di steroidi neuroattivi e altera la trasmissione GABAergica, è stato valutato se tale trattamento fosse in grado di alterare la risposta allo stress acuto nei ratti femmina in età adulta.

I risultati ottenuti dimostrano che i ratti estrogenizzati alla nascita, sottoposti al foot-shock stress in età adulta, mostrano un aumento marcato dei livelli di allopregnanolone in diverse aree cerebrali. Più precisamente, l'esposizione a questo stress acuto induce un incremento dei livelli di allopregnanolone nell'ipotalamo (+109%, $p < 0.001$, Figura 16a), ippocampo (+168%, $p < 0.001$, Figura 16b), corteccia cerebrale (+167%, $p < 0.05$, Figura 16c) e plasma (+86%, $p < 0.05$, Figura 16d). Al contrario, in contrasto con quello che avviene nel maschio (Barbaccia et al., 1997), il foot-shock stress non modifica le concentrazioni di allopregnanolone, misurate nelle stesse aree, nei ratti femmina trattati alla nascita con olio di sesamo (Figure 16a-d). Come previsto (Calza et al., 2010; Berretti et al., 2014; Figura 10b), negli animali non stressati, il trattamento neonatale con estradiolo riduce significativamente le concentrazioni di allopregnanolone a livello ipotalamico (-50%, $p < 0.001$, Figura 16a), ippocampale (-46%, $p < 0.01$, Figura 16b), cerebrocorticale (-79%,

$p < 0.001$, Figura 16c) e plasmatico (-75% , $p < 0.001$, Figura 16d), rispetto agli animali di controllo trattati con olio di sesamo.

Nel complesso, questi risultati dimostrano che il trattamento con estradiolo il giorno della nascita aumenta la sensibilità allo stress, come dimostrato dalla maggior secrezione di allopregnanolone in risposta ad uno stimolo stressante.

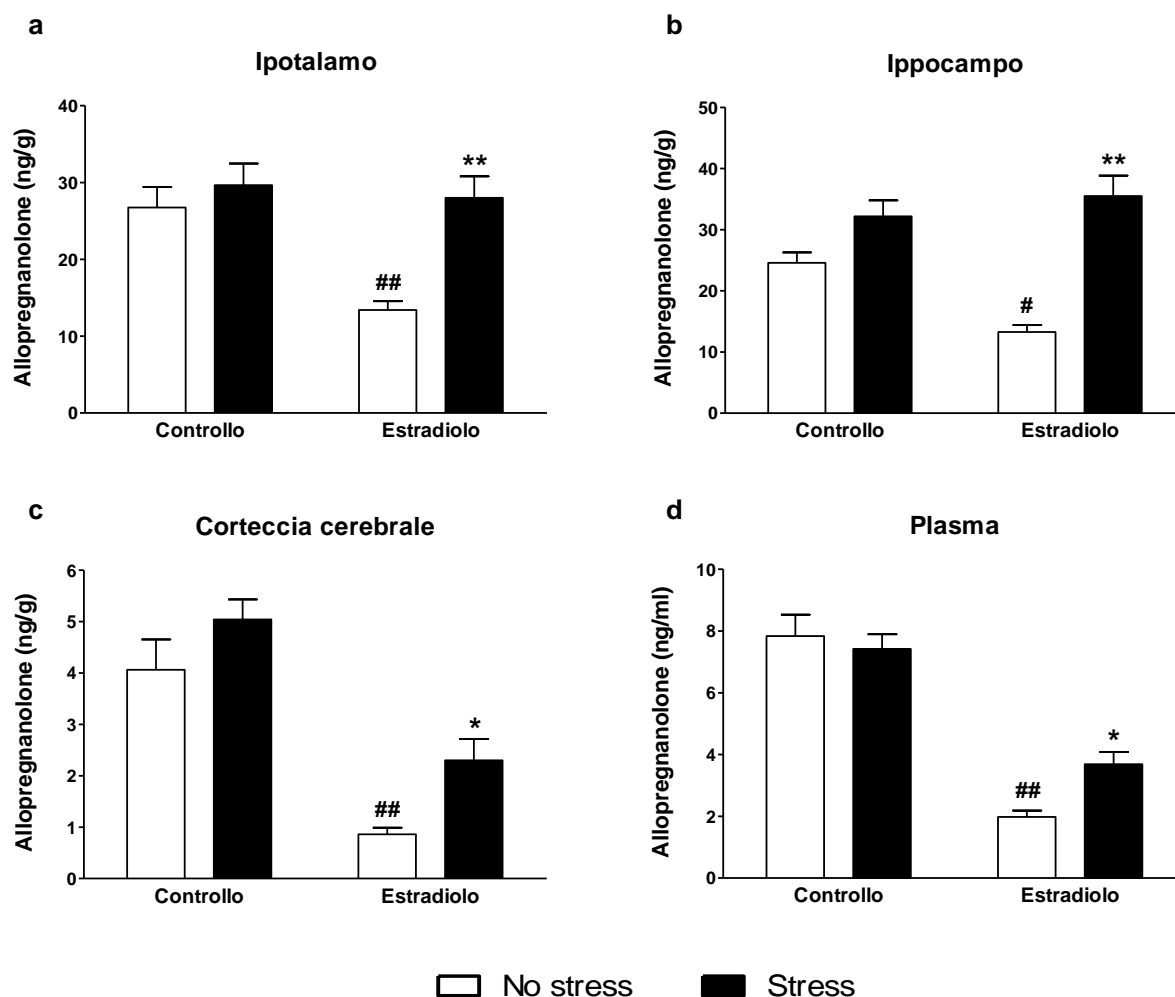


Figura 16. Effetto della somministrazione neonatale di estradiolo sulle concentrazioni di allopregnanolone indotte da foot-shock stress. Gli animali sono stati trattati entro 24 ore dalla nascita con estradiolo benzoato ($10 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ /ratto, s.c.) o con un ugual volume di solvente (Controllo). In età adulta (60-90 giorni) sono stati sottoposti al foot-shock stress per 8 minuti e sacrificati 30 minuti dall'inizio dello stress (barre nere). I gruppi di controllo non stressati (barre bianche) sono stati posti nell'apparato del foot-shock per lo stesso intervallo di tempo, senza però ricevere la scossa. I dati sono espressi in nanogrammi di steroide per grammo di tessuto o ml di plasma e rappresentano la media \pm SEM di 12 animali per gruppo.

* $p < 0.05$ e ** $p < 0.001$ vs. il rispettivo gruppo di controllo non stressato; # $p < 0.01$ e ## $p < 0.001$ vs. il rispettivo gruppo di controllo trattato con olio di sesamo.

Per valutare se la maggior sensibilità allo stress osservata nelle femmine trattate con estradiolo alla nascita fosse dovuta ad alterazioni nella funzionalità dell'asse IIS, sono stati

misurati negli stessi animali i livelli di corticosterone, ormone steroideo che riveste un ruolo chiave nella risposta allo stress indotta dall'attivazione dell'asse IIS. I risultati ottenuti dimostrano che il foot-shock stress aumenta i livelli di corticosterone in maniera simile nei controlli e nei ratti estrogenizzati alla nascita a livello ipotalamico (Controllo 325%, $p<0.001$, Estradiolo 307%, $p<0.001$, Figura 17a), ippocampale (Controllo +293%, $p<0.001$, Estradiolo +436%, $p<0.001$, Figura 17b) e plasmatico (Controllo +71%, $p<0.001$, Estradiolo +98%, $p<0.001$, Figura 17d); al contrario, a livello cerebrocorticale il foot-shock stress induce un aumento significativo dei livelli di corticosterone solo nel gruppo dei ratti femmina estrogenizzati alla nascita (+110%, $p<0.001$, Figura 17c).

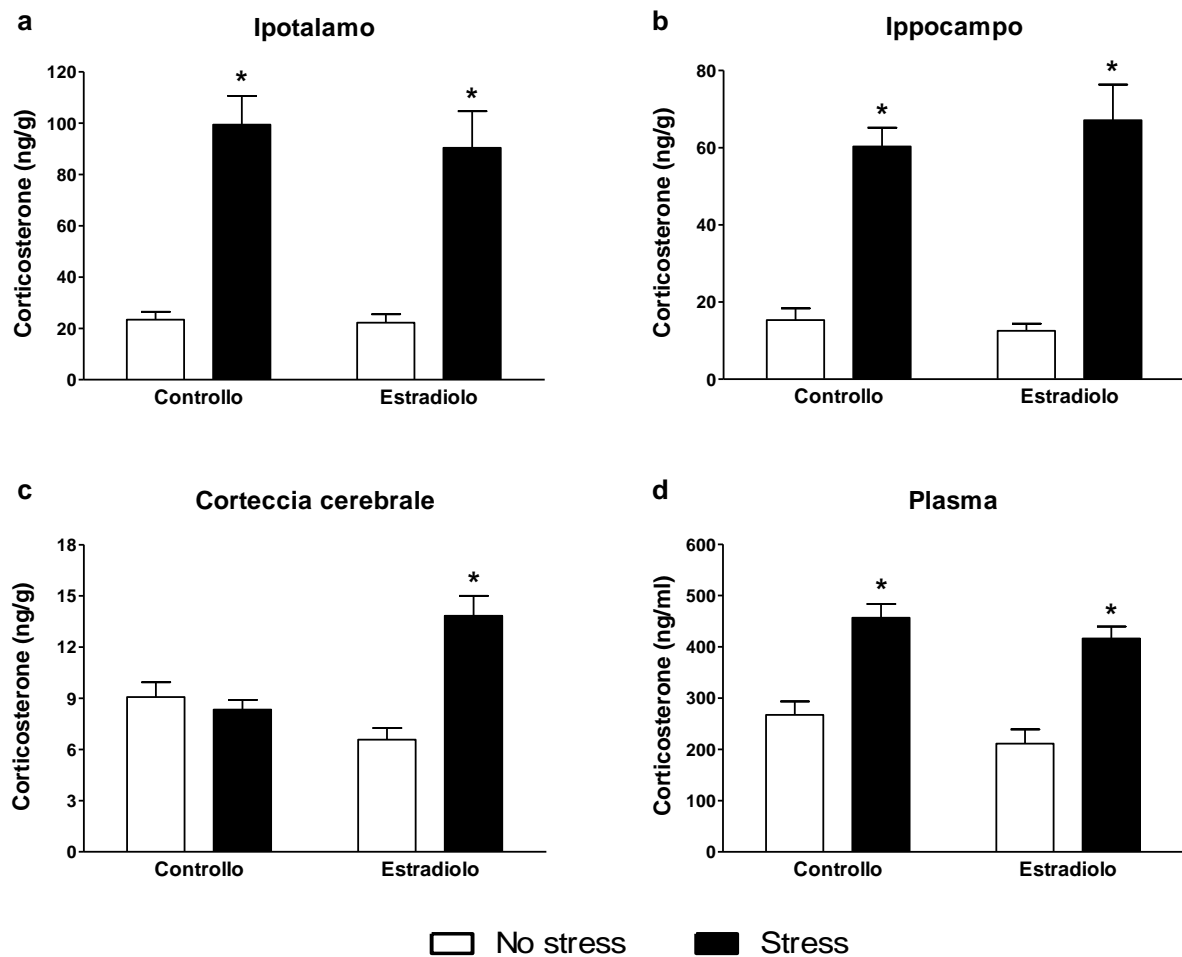


Figura 17. Effetto della somministrazione neonatale di estradiolo sulle concentrazioni di corticosterone indotte da foot-shock stress. Gli animali sono stati trattati entro 24 ore dalla nascita con estradiolo benzoato (10 μ g/50 μ l/ratto, s.c.) o con un ugual volume di solvente (Controllo). In età adulta (60-90 giorni) sono stati sottoposti al foot-shock stress per 8 minuti e sacrificati 30 minuti dall'inizio dello stress (barre nere). I gruppi di controllo non stressati (barre bianche) sono stati posti nell'apparato del foot-shock per lo stesso intervallo di tempo, senza però ricevere la scossa. I dati sono espressi in nanogrammi di steroide per grammo di tessuto o ml di plasma e rappresentano la media \pm SEM di 12 animali per gruppo.

* $p < 0.001$ vs. il rispettivo gruppo di controllo non stressato.

Questi risultati suggeriscono che la maggior sensibilità allo stress nelle femmine trattate con estradiolo alla nascita non sembra essere dovuta ad alterazioni nella funzionalità dell'asse IIS, dal momento che l'asse risponde allo stress aumentando i livelli di corticosterone in modo simile negli animali trattati con estradiolo alla nascita e in quelli di controllo trattati con olio di sesamo.

Per approfondire ulteriormente eventuali alterazioni nella funzionalità dell'asse IIS nei ratti femmina estrogenizzati alla nascita, gli animali sono stati sottoposti al test di soppressione dell'asse IIS indotta da desametasone, un analogo sintetico del corticosterone, in grado di mimare la risposta da feedback negativo che si ha fisiologicamente in seguito all'aumento di corticosterone causato da stress acuto. Questi risultati dimostrano che il desametasone riduce significativamente i livelli di corticosterone in maniera del tutto comparabile sia negli animali di controllo che in quelli trattati alla nascita con estradiolo; questo effetto è simile sia a livello ipotalamico (Controllo -82%, $p<0.001$, Estradiolo -81%, $p<0.001$, Figura 18a) che plasmatico (Controllo -90%, $p<0.001$, Estradiolo -87%, $p<0.001$, Figura 18b).

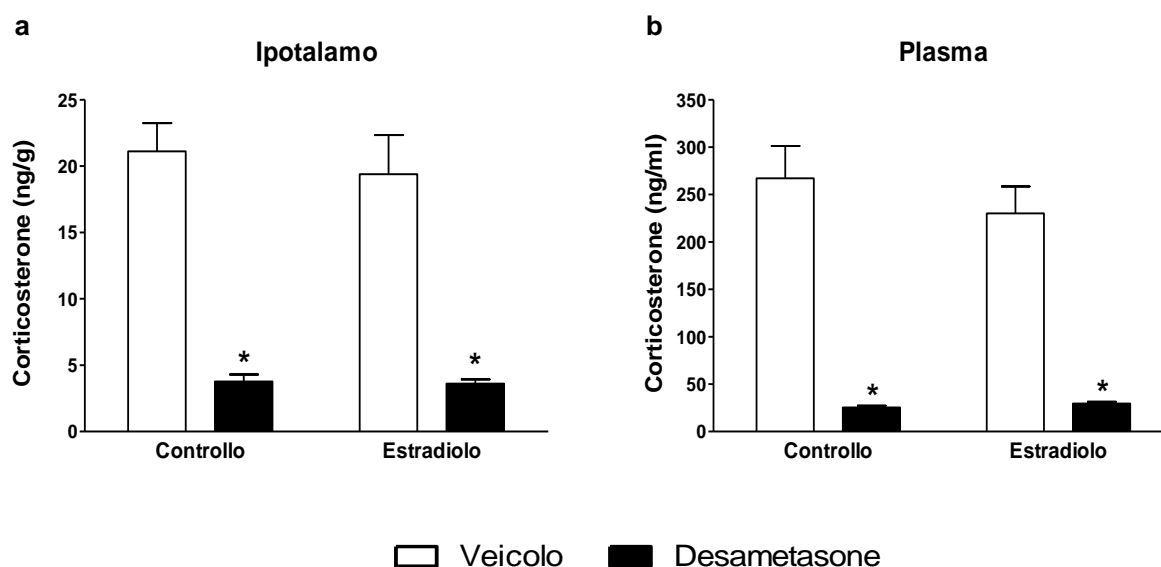


Figura 18. Effetto della somministrazione neonatale di estradiolo sulla diminuzione dei livelli di corticosterone indotta dal test di soppressione da desametasone. Gli animali sono stati trattati entro 24 ore dalla nascita con estradiolo benzoato (10 μ g/50 μ l/ratto, s.c.) o con un ugual volume di solvente (Controllo). In età adulta (60-90 giorni) hanno ricevuto una singola somministrazione di desametasone (0.5 mg/kg, i.p.) e sono stati sacrificati 150 minuti dopo per la misurazione dei livelli di corticosterone nell'ipotalamo e nel plasma. I dati sono espressi in nanogrammi di steroide per grammo di tessuto o ml di plasma e rappresentano la media \pm SEM di 12 animali per gruppo.

* $p<0.001$ vs. il rispettivo gruppo di controllo trattato con solvente.

Infine, come ulteriore indice di funzionalità dell'asse IIS, sono state valutate eventuali differenze nei livelli proteici dei recettori GR e MR a livello ippocampale, vista l'importanza di quest'area cerebrale nell'attivazione del feedback negativo indotto dallo stress acuto. I risultati ottenuti dimostrano che il trattamento neonatale con estradiolo non altera i livelli dei recettori GR (Figura 19a) e MR (Figura 19b) nell'ippocampo di ratti femmina adulti.

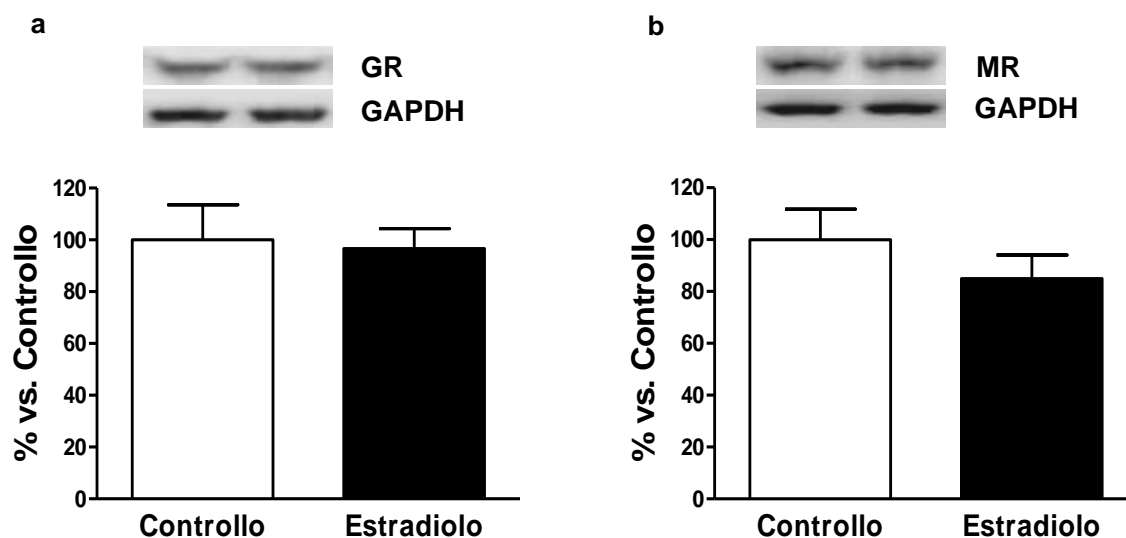


Figura 19. Il trattamento neonatale con estradiolo non modifica i livelli proteici di GR e MR nell'ippocampo di ratti femmina adulti. Gli animali sono stati trattati entro 24 ore dalla nascita con estradiolo benzoato (10 μ g/50 μ l/ratto, s.c.) o con un ugual volume di solvente e sacrificati a 60-90 giorni d'età. I dati sono espressi come percentuale di variazione rispetto al valore del gruppo di controllo e rappresentano la media \pm SEM di 12 animali per gruppo. Le immagini sopra ogni grafico sono le bande rappresentative degli immunoblot per ciascuna proteina e per la proteina di riferimento GAPDH.

Poichè i recettori GR sono espressi anche nell'ipotalamo (Reul & de Kloet, 1985), sono state valutate eventuali differenze nei livelli proteici di questi recettori a livello ipotalamico; anche in quest'area il trattamento neonatale con estradiolo non modifica i livelli di recettori GR nei ratti femmina adulti (Figura 20).

Nel complesso questi risultati dimostrano che il trattamento neonatale con estradiolo aumenta la sensibilità allo stress nei ratti femmina in età adulta, senza modificare la funzionalità dell'asse IIS. Infatti, i ratti trattati alla nascita con estradiolo mostrano un aumento significativo dei livelli ipotalamici, ippocampali, cerebrocorticali e plasmatici di allopregnanolone in seguito a foot-shock stress, effetto non riscontrato negli animali di

controllo sottoposti allo stesso paradigma. Tuttavia, l'aumento delle concentrazioni di corticosterone indotto dallo stress è simile tra i due gruppi, e allo stesso tempo la sensibilità al feedback negativo e l'espressione dei recettori GR e MR non differiscono tra gli animali trattati con estradiolo alla nascita e quelli di controllo.

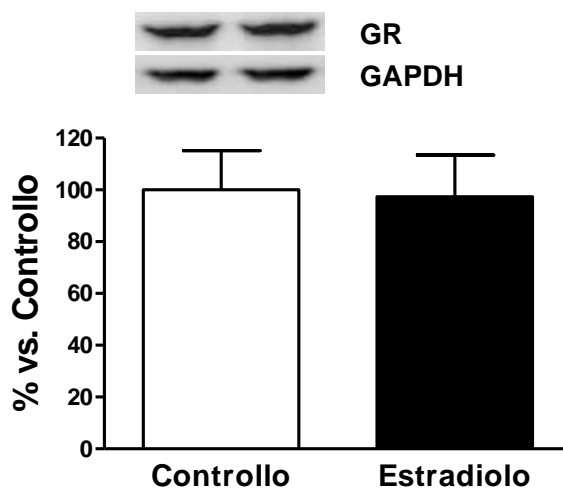


Figura 20. Il trattamento neonatale con estradiolo non modifica i livelli proteici di GR nell'ipotalamo di ratti femmina adulti. Gli animali sono stati trattati entro 24 ore dalla nascita con estradiolo benzoato (10 μ g/50 μ l/ratto, s.c.) o con un ugual volume di solvente e sacrificati a 60-90 giorni d'età. I dati sono espressi come percentuale di variazione rispetto al valore del gruppo di controllo e rappresentano la media \pm SEM di 12 animali per gruppo. Le immagini sopra ogni grafico sono le bande rappresentative degli immunoblot per ciascuna proteina e per la proteina di riferimento GAPDH.

L'allopregnanolone gioca un ruolo fondamentale nella regolazione della risposta allo stress. Esistono infatti numerose evidenze sperimentali che dimostrano che l'esposizione a diversi stimoli stressanti aumenta i livelli cerebrali e plasmatici degli steroidi neuroattivi nel ratto maschio (Purdy et al., 1991; Barbaccia et al., 1994; Barbaccia et al., 1996a; Barbaccia et al., 1997; Vallée et al., 2000). Lo stress acuto aumenta le concentrazioni plasmatiche di allopregnanolone anche nell'uomo (Girdler et al., 2001; Droogleever Fortuyn et al., 2004). L'esposizione a stress acuto porta ad attivazione dell'asse IIS, con conseguente rilascio di corticosterone e di steroidi neuroattivi a livello del surrene; è stato però dimostrato che lo stress acuto aumenta i livelli cerebrali di allopregnanolone anche in ratti surrenectomizzati, suggerendo l'esistenza di una parallela risposta allo stress acuto a livello centrale (Purdy et al., 1991). Gli steroidi neuroattivi agiscono tramite feedback negativo inibendo il rilascio di CRH, ACTH e corticosterone (Patchev et al., 1994; Patchev et al. 1996), modulando così la risposta neuroendocrina allo stress acuto. È da tenere in considerazione il fatto che

queste evidenze sperimentali sono state ottenute da studi su ratti maschio. L'evidenza che i ratti femmina di controllo, trattati alla nascita con olio di sesamo, non mostrano aumenti dei livelli di allopregnanolone in seguito ad esposizione a foot-shock stress potrebbe suggerire l'esistenza di diverse modalità di regolazione della risposta allo stress tra ratto maschio e ratto femmina. Le concentrazioni endogene di allopregnanolone, più elevate nei ratti femmina rispetto ai maschi, potrebbero mascherare l'effetto dello stress sull'asse IIS e rendere le femmine meno sensibili all'aumento di questo steroide neuroattivo indotto dallo stress. In accordo con questa ipotesi, i ratti femmina trattati alla nascita con estradiolo, che influenza i processi di mascolinizzazione e defemminizzazione a livello delle aree soggette a dimorfismo sessuale tra cui l'ipotalamo (McCarthy, 2008; McCarthy, 2013), mostrano un aumento dei livelli cerebrali e plasmatici di allopregnanolone in seguito a stress acuto, suggerendo una modalità di modulazione della risposta allo stress acuto simile a quella caratteristica del ratto maschio. Studi futuri saranno sicuramente volti ad approfondire questo aspetto.

Questi risultati dimostrano anche che il trattamento neonatale con estradiolo non altera la funzionalità dell'asse IIS in ratti femmina adulti. Se da un lato in letteratura non esistono evidenze sull'effetto dell'esposizione neonatale ad estrogeni sulla regolazione, indotta dall'allopregnanolone, della risposta allo stress in ratti femmina adulti, d'altro lato sono presenti diversi studi di differenze di genere, indotte dall'estradiolo durante lo sviluppo, riguardanti il diverso assetto dell'asse IIS tra maschi e femmine sia nel ratto che nell'uomo. Infatti, è stato dimostrato che esistono differenze di genere per quanto riguarda l'espressione dell'ormone CRH e i recettori GR e MR a livello sia ippocampale che ipotalamico, la secrezione circadiana di corticosterone e tutta una serie di altri parametri connessi all'asse IIS (Kitay, 1961; Critchlow et al., 1963; Kant et al., 1983; Patchev et al., 1995; Seeman et al., 1995; van Cauter et al., 1996). È anche stato dimostrato che i ratti maschi rispondono in maniera differente al test di soppressione da desametasone rispetto ai ratti femmina (Almeida et al., 1997). Inoltre, è stato dimostrato che l'esposizione in periodo perinatale ad estrogeni modifica drasticamente l'assetto dell'asse IIS in ratti femmina adulti, nello specifico a livello dell'espressione dei geni che codificano per il CRH, l'arginina-vasopressina e i recettori GR, portando quindi ad una "defemminizzazione" di questo sistema (Patchev et al., 1995). I risultati qui presentati sono in contrasto con queste evidenze; infatti negli esperimenti di questa tesi è stato osservato che il trattamento neonatale con estradiolo non altera la funzionalità dell'asse IIS, in termini di aumento di

corticosterone in risposta allo stress, sensibilità al feedback negativo e espressione dei recettori GR e MR. La discrepanza tra questi risultati e l'effetto "defeminizzante" sull'asse IIS indotto dall'esposizione neonatale ad estradiolo osservato da Patchev e colleghi (Patchev et al., 1995) potrebbe essere dovuto al diverso protocollo di somministrazione dell'estradiolo. Infatti, il protocollo utilizzato da Patchev e colleghi prevede la somministrazione di 10 µg di estradiolo una volta al giorno per i primi sette giorni postnatali, mentre il protocollo sperimentale utilizzato per gli esperimenti di questa tesi prevede un'unica somministrazione di 10 µg di estradiolo il giorno della nascita; è quindi possibile che quest'ultimo protocollo sperimentale, riguardando una finestra temporale più circoscritta, non sia efficace nell'influenzare direttamente il corretto sviluppo dell'asse IIS. In supporto a quest'ipotesi, esiste un'ulteriore evidenza in letteratura secondo cui il trattamento di ratti femmina con una singola somministrazione di testosterone (120 ore dopo la nascita) o di estradiolo (96 ore dopo la nascita), non modifica la risposta del corticosterone allo stress acuto in ratti femmina adulti (Levine & Mullins, 1967). Questa evidenza è in accordo con i risultati riportati in questa tesi secondo cui, l'aumento delle concentrazioni di corticosterone nell'ippocampo, nell'ipotalamo e nel plasma, indotto dal foot-shock stress, è simile tra i ratti trattati con estradiolo alla nascita e quelli di controllo. Sorprendentemente, questi risultati dimostrano che il foot-shock stress, al contrario di quanto visto negli animali estrogenizzati alla nascita, non aumenta le concentrazioni cerebrocorticali di corticosterone nei ratti femmina di controllo. Questo effetto potrebbe essere dovuto ad una differente regolazione della sintesi di corticosterone a livello cerebrocorticale rispetto alle altre regioni del cervello, regolazione che può essere influenzata dall'esposizione ad estradiolo nel periodo perinatale. La sintesi di corticosterone a livello cerebrale è poco conosciuta e studiata; ulteriori studi sono necessari per chiarirne i meccanismi.

Effetto del trattamento neonatale con estradiolo sulla sensibilità dei neuroni dopaminergici mesocorticali allo stress acuto in ratti femmina adulti

L'allopregnanolone gioca un ruolo importante anche nella regolazione della risposta monoaminergica allo stress (Motzo et al., 1996; Dazzi et al., 2002). In collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Laura Dazzi del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università degli Studi di Cagliari, è stato valutato se la persistente

riduzione dei livelli basali di allopregnanolone, osservata nei ratti femmina adulti trattati alla nascita con estradiolo, fosse in grado di alterare la sensibilità dei neuroni dopaminergici mesocorticali all'esposizione ad uno stress acuto. Come mostrato in figura 21a, l'esposizione dei ratti femmina di controllo al foot-shock stress induce un significativo e transitorio aumento dei livelli extracellulari di dopamina nella corteccia prefrontale (+145%, $p < 0.001$ vs. il corrispettivo valore di base) che è osservabile soltanto dieci minuti dopo l'esposizione allo stress. Nei ratti femmina trattati alla nascita con estradiolo invece l'aumento dei livelli extracellulari di dopamina nella corteccia prefrontale è risultato nettamente maggiore (+550%, $p < 0.001$ vs. il corrispettivo valore di base) e più duraturo (40 minuti) rispetto a quanto osservato negli animali di controllo (Figura 21b).

Per stabilire se la riduzione dei livelli di allopregnanolone, riscontrata nei ratti estrogenizzati alla nascita, potesse contribuire all'aumento della sensibilità allo stress acuto osservata in età adulta, gli animali trattati alla nascita con estradiolo sono stati sottoposti in età adulta a trattamento subcronico con progesterone, con lo scopo di ripristinare i livelli endogeni di allopregnanolone (Dazzi et al., 2002). I risultati dimostrano che il trattamento con progesterone (1 mg/kg, s.c., 2 volte al giorno per 5 giorni) riduce drasticamente l'aumento, indotto dal foot-shock stress, delle concentrazioni extracellulari di dopamina nella corteccia prefrontale di ratti femmina trattati alla nascita con estradiolo (+92% vs. +550%, $p < 0.01$; Figura 21b). Nei ratti di controllo, il trattamento subcronico con progesterone induce una tendenza alla riduzione nelle concentrazioni extracellulari di dopamina nella corteccia prefrontale (+60% vs. +145%; Figura 21a), che tuttavia non è statisticamente significativa.

É noto dalla letteratura che la somministrazione di progesterone o del suo metabolita neuroattivo allopregnanolone è in grado di indurre un aumento della soglia nocicettiva (Frye & Duncan, 1994). Per stabilire quindi se il trattamento subcronico con progesterone fosse in grado di alterare la soglia di nocicezione negli animali sperimentali, e di conseguenza di alterare la sensibilità alle scosse elettriche del foot-shock stress, un gruppo separato di animali è stato sottoposto al test del hot plate.

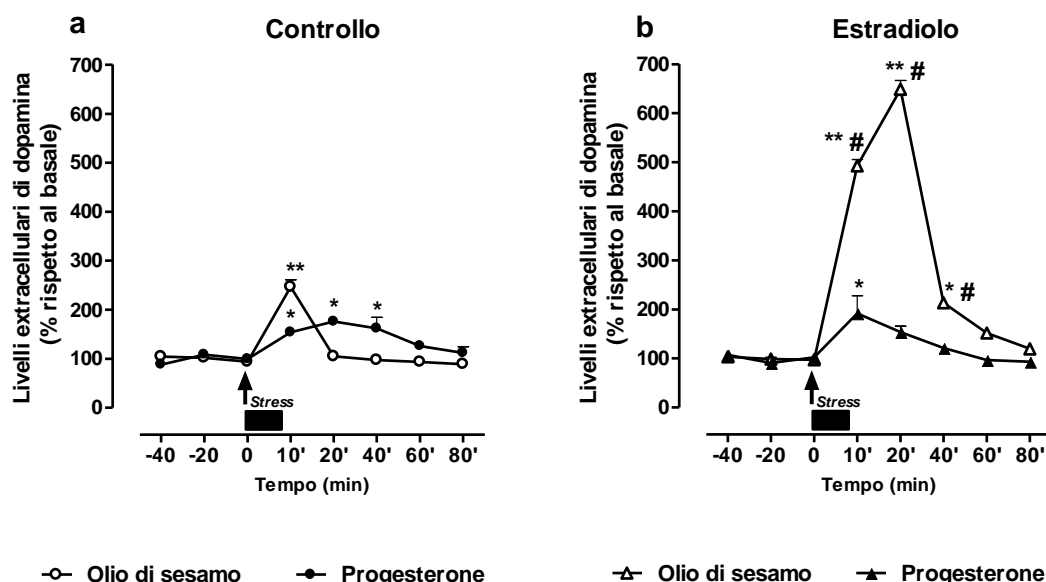


Figura 21. Il trattamento neonatale con estradiolo aumenta la sensibilità allo stress nei ratti femmina adulti: effetto revertito dal trattamento con progesterone. Gli animali sono stati trattati entro 24 ore dalla nascita con estradiolo benzoato (10 µg/50 µl/ratto, s.c.; triangoli, pannello b) o con veicolo (Controllo, 50 µl/ratto, s.c.; cerchi, pannello a) e sono stati sottoposti a foot-shock stress a 60-90 giorni d'età. Nel corso dei 5 giorni precedenti il test del foot-shock, ogni gruppo è stato trattato subcronicamente con progesterone (1 mg/kg/1 ml, s.c., 2 volte al giorno; simboli in nero) o con veicolo (olio di sesamo, 1 ml/kg, s.c., 2 volte al giorno; simboli in bianco). Gli animali sono stati sottoposti a foot-shock stress (0.2 mA, 500 msec/sec) per 8 minuti e i livelli di dopamina sono stati misurati nella corteccia prefrontale con la tecnica della microdialisi. I dati sono espressi come percentuale di variazione rispetto ai valori basali e rappresentano la media ± SEM di 5 animali per gruppo.

* $p < 0.05$ e ** $p < 0.001$ vs. i corrispettivi valori basali; # $p < 0.01$ vs. il corrispondente valore del gruppo trattato subcronicamente con olio di sesamo.

I risultati dimostrano che il trattamento subcronico con progesterone non induce modificazioni significative per quanto riguarda i livelli di nocicezione nè negli animali di controllo nè negli animali estrogenizzati alla nascita (Figura 22).

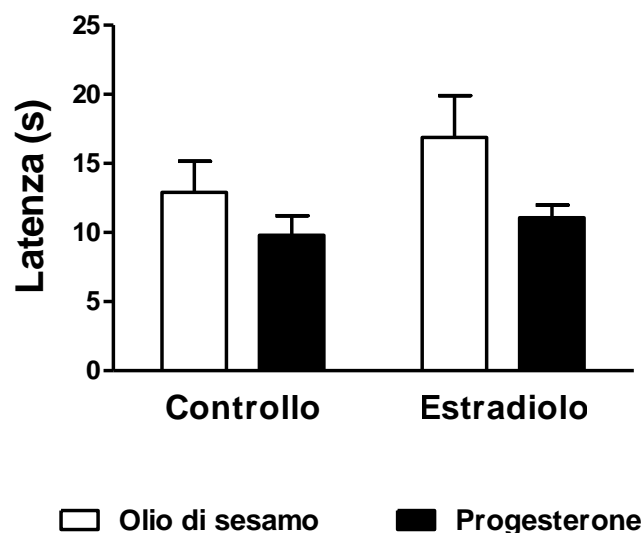


Figura 22. Il trattamento subcronico con progesterone non altera la soglia nocicettiva nei ratti femmina adulti trattati con estradiolo alla nascita. Gli animali sono stati trattati entro 24 ore dalla nascita con estradiolo benzoato (10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ /ratto, s.c.) o con veicolo (Controllo, 50 μl /ratto, s.c.) e sono stati sottoposti al test del hot plate a 60-90 giorni d'età. Nel corso dei 5 giorni precedenti il test del hot plate, ogni gruppo è stato trattato subcronicamente con progesterone (1 mg/kg/1 ml, s.c., 2 volte al giorno) o con veicolo (olio di sesamo, 1 ml/kg, s.c., 2 volte al giorno). Gli animali sono stati sottoposti al test del hot plate ($51 \pm 0.5^\circ\text{C}$) ed è stata valutata la latenza al sollevamento/leccamento di una o più zampe. I dati rappresentano la media \pm SEM di 5-7 animali per gruppo.

Il marcato aumento indotto dal foot-shock stress delle concentrazioni extracellulari di dopamina a livello della corteccia prefrontale nei ratti trattati alla nascita con estradiolo, insieme all'aumento dei livelli cerebrali di allopregnanolone, dimostra che le femmine estrogenizzate alla nascita mostrano una maggiore sensibilità allo stress. I livelli extracellulari di dopamina a livello della corteccia prefrontale sono molto sensibili a tutta una serie di stimoli stressanti acuti (Finlay et al., 1995; Motzo et al., 1996; Ulrich-Lai & Herman, 2009), e allo stesso tempo sono fortemente influenzati dagli steroidi ovarici progesterone e allopregnanolone (Dazzi et al., 2007). I livelli endogeni di allopregnanolone, tra le varie funzioni, contribuiscono anche alla fisiologica regolazione del rilascio di dopamina nella corteccia prefrontale, sia in condizioni basali che in seguito a stimoli stressanti (Motzo et al., 1996), mentre la drastica riduzione delle concentrazioni di allopregnanolone esacerba l'aumento del rilascio di dopamina indotto da stress acuto sempre nella stessa area cerebrale (Dazzi et al., 2002). Questi effetti sono da mettere in relazione al presunto ruolo fisiologico dell'allopregnanolone sulla risposta allo stress (Biggio et al., 2007). Pertanto, la diminuzione dei livelli cerebrali di allopregnanolone,

indotta dal trattamento neonatale con estradiolo (Calza et al., 2010; Berretti et al., 2014; Figura 10b), potrebbe essere correlata al maggior rilascio di dopamina indotto dallo stress nella corteccia prefrontale degli animali estrogenizzati alla nascita. Quest'ipotesi è supportata dai risultati riportati in questa tesi che dimostrano come, ripristinando i livelli endogeni di allopregnanolone negli animali estrogenizzati alla nascita mediante un trattamento subcronico con progesterone, trattamento che di per sé non è in grado di alterare i livelli basali di dopamina extracellulare (Dazzi et al., 2002), si previene il drastico aumento di dopamina extracellulare indotto dallo stress acuto in corteccia prefrontale. È importante sottolineare che questo risultato non sembra essere dovuto all'effetto antinocicettivo del progesterone (Frye & Duncan, 1994), dal momento che il trattamento subcronico con progesterone non modifica la soglia del dolore né nel gruppo di ratti estrogenizzati alla nascita né in quelli di controllo.

Nel complesso, i dati ottenuti dimostrano che l'effetto del trattamento neonatale con estradiolo sulla sensibilità allo stress acuto in età adulta, sembrerebbe riguardare nello specifico meccanismi di modulazione centrali, senza tuttavia alterare la funzionalità e l'integrità dell'asse IIS.

CONCLUSIONI

È noto dalla letteratura che l'esposizione ad estradiolo durante il periodo perinatale influenza il differenziamento cerebrale tramite processi di mascolinizzazione e di defeminizzazione che coinvolgono specifiche regioni implicate nel comportamento sessuale in età adulta (McCarthy, 2008; McCarthy, 2013). Recentemente sono stati messi in evidenza alcuni dei meccanismi epigenetici tramite i quali la somministrazione neonatale di estradiolo induce direttamente l'espressione di geni di importanza critica per lo sviluppo cerebrale (Nugent et al., 2015).

Nel cervello del ratto neonato, il GABA funge da neurotrasmettitore eccitatorio e dirige i processi di proliferazione cellulare e di integrazione sinaptica (McCarthy, 2008). L'esposizione neonatale ad estradiolo prolunga il periodo in cui il GABA ha un effetto eccitatorio sui neuroni ippocampali (Perrot-Sinal et al., 2001; Nuñez et al., 2005), e quest'azione dell'estradiolo sulla trasmissione GABAergica potrebbe essere importante per lo sviluppo del cervello e l'instaurarsi del dimorfismo sessuale. I risultati riportati in questa tesi dimostrano che l'esposizione ad estradiolo in età neonatale altera da un lato i livelli del modulatore GABAergico endogeno allopregnanolone, dall'altro l'espressione dei recettori GABA_A nell'ippocampo di ratti femmina adulti, effetto che in ultimo modifica il pattern delle correnti inibitorie mediate da questi stessi recettori. Inoltre, il trattamento neonatale con estradiolo aumenta la sensibilità allo stress acuto, un effetto che sembra dipendere dalle concentrazioni di allopregnanolone a livello cerebrale. I precisi meccanismi molecolari che stanno alla base di queste alterazioni e il preciso arco temporale nel quale insorgono devono essere ancora chiariti.

Dal momento che i recettori GABA_A regolano l'eccitabilità neuronale e sono coinvolti in numerosi processi neuropsicofisiologici, le alterazioni dell'espressione e della funzione di questi recettori, indotte dall'esposizione neonatale ad estradiolo, potrebbero essere rilevanti per l'insorgenza di patologie neuropsichiatriche che originano già durante lo sviluppo cerebrale e che hanno una differente incidenza tra sesso maschile e femminile. La somministrazione neonatale di estradiolo rappresenta dunque un valido e pratico modello di riduzione duratura degli steroidi neuroattivi nell'adulto, in cui studiare il ruolo svolto da questi ormoni nella regolazione della plasticità dei recettori GABA_A e nei comportamenti animali ad esso associati.

BIBLIOGRAFIA

- Abramian AM, Comenencia-Ortiz E, Modgil A, Vien TN, Nakamura Y, Moore YE, Maguire JL, Terunuma M, Davies PA, Moss SJ. *Neurosteroids promote phosphorylation and membrane insertion of extrasynaptic GABAA receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 May 13;111(19):7132-7.
- Aguilar E, Fernández Galaz C, Vaticón MD, Tejero A, Oriol A. *Oestrogen-bromocriptine interaction in the control of luteinizing hormone and prolactin secretion in the neonatally oestrogenized female rat*. J Endocrinol. 1983 Jun;97(3):319-25.
- Aguilar E, Tejero A, Vaticón MD, Fernández Galaz C. *Dissociation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone control mechanisms in male and female rats by neonatal administration of estradiol benzoate or testosterone propionate*. Horm Res. 1984;19(2):108-16.
- Almeida OF, Canoine V, Ali S, Holsboer F, Patchev VK. *Activational effects of gonadal steroids on hypothalamo-pituitary-adrenal regulation in the rat disclosed by response to dexamethasone suppression*. J Neuroendocrinol. 1997 Feb;9(2):129-34.
- Amateau SK, Alt JJ, Stamps CL, McCarthy MM. *Brain estradiol content in newborn rats: sex differences, regional heterogeneity, and possible de novo synthesis by the female telencephalon*. Endocrinology. 2004 Jun;145(6):2906-17.
- Amateau SK, McCarthy MM. *Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior*. Nat Neurosci. 2004 Jun;7(6):643-50.
- Azzolina B, Ellsworth K, Andersson S, Geissler W, Bull HG, Harris GS. *Inhibition of rat alpha-reductases by finasteride: evidence for isozyme differences in the mechanism of inhibition*. J Steroid Biochem Mol Biol. 1997 Apr;61(1-2):55-64.
- Barbaccia ML, Roscetti G, Trabucchi M, Cuccheddu T, Concas A, Biggio G. *Neurosteroids in the brain of handling-habituated and naive rats: effect of CO2 inhalation*. Eur J Pharmacol. 1994 Aug 22;261(3):317-20.
- Barbaccia ML, Roscetti G, Trabucchi M, Mostallino MC, Concas A, Purdy RH, Biggio G. *Time-dependent changes in rat brain neuroactive steroid concentrations and GABAA receptor function after acute stress*. Neuroendocrinology. 1996 Feb;63(2):166-72.

- Barbaccia ML, Roscetti G, Bolacchi F, Concas A, Mostallino MC, Purdy RH, Biggio G. *Stress-induced increase in brain neuroactive steroids: antagonism by abecarnil*. Pharmacol Biochem Behav. 1996 May;54(1):205-10.
- Barbaccia ML, Roscetti G, Trabucchi M, Purdy RH, Mostallino MC, Concas A, Biggio G. *The effects of inhibitors of GABAergic transmission and stress on brain and plasma allopregnanolone concentrations*. Br J Pharmacol. 1997 Apr;120(8):1582-8.
- Barbaccia ML, Serra M, Purdy RH, Biggio G. *Stress and neuroactive steroids*. Int Rev Neurobiol. 2001;46:243-72.
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. International Union of Pharmacology. XV. *Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function*. Pharmacol Rev. 1998 Jun;50(2):291-313.
- Belelli D, Bolger MB, Gee KW. *Anticonvulsant profile of the progesterone metabolite 5 alpha-pregnan-3 alpha-ol-20-one*. Eur J Pharmacol. 1989 Jul 18;166(2):325-9.
- Belelli D, Casula A, Ling A, Lambert JJ. *The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors*. Neuropharmacology. 2002 Sep;43(4):651-61.
- Belelli D, Lambert JJ. *Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor*. Nat Rev Neurosci. 2005 Jul;6(7):565-75.
- Benke D, Michel C, Mohler H. *GABA(A) receptors containing the alpha4-subunit: prevalence, distribution, pharmacology, and subunit architecture in situ*. J Neurochem. 1997 Aug;69(2):806-14.
- Berretti R, Santoru F, Locci A, Sogliano C, Calza A, Choleris E, Porcu P, Concas A. *Neonatal exposure to estradiol decreases hypothalamic allopregnanolone concentrations and alters agonistic and sexual but not affective behavior in adult female rats*. Horm Behav. 2014 Feb;65(2):142-53.
- Bianchi MT, Macdonald RL. *Neurosteroids shift partial agonist activation of GABA(A) receptor channels from low- to high-efficacy gating patterns*. J Neurosci. 2003 Nov 26;23(34):10934-43.
- Biggio G, Concas A, Follesa P, Sanna E, Serra M. *Stress, ethanol, and neuroactive steroids*. Pharmacol Ther. 2007 Oct;116(1):140-71.
- Biggio G, Pisu MG, Biggio F, Serra M. *Allopregnanolone modulation of HPA axis function in the adult rat*. Psychopharmacology (Berl). 2014 Sep;231(17):3437-44.

- Bitran D, Hilvers RJ, Kellogg CK. *Anxiolytic effects of 3 alpha-hydroxy-5 alpha[beta]-pregnan-20-one: endogenous metabolites of progesterone that are active at the GABAA receptor.* Brain Res. 1991 Oct 4;561(1):157-61.
- Bitran D, Purdy RH, Kellogg CK. *Anxiolytic effect of progesterone is associated with increases in cortical allopregnanolone and GABAA receptor function.* Pharmacol Biochem Behav. 1993 Jun;45(2):423-8.
- Bitran D, Shiekh M, McLeod M. *Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABAA receptors.* J Neuroendocrinol. 1995 Mar;7(3):171-7.
- Bitran D, Smith SS. *Termination of pseudopregnancy in the rat produces an anxiogenic-like response that is associated with an increase in benzodiazepine receptor binding density and a decrease in GABA-stimulated chloride influx in the hippocampus.* Brain Res Bull. 2005 Jan 30;64(6):511-8.
- Bogdanov Y, Michels G, Armstrong-Gold C, Haydon PG, Lindstrom J, Pangalos M, Moss SJ. *Synaptic GABAA receptors are directly recruited from their extrasynaptic counterparts.* EMBO J. 2006 Sep 20;25(18):4381-9.
- Brinton RD. *Neurosteroids as regenerative agents in the brain: therapeutic implications.* Nat Rev Endocrinol. 2013; 9(4): 241-50.
- Brown N, Kerby J, Bonnert TP, Whiting PJ, Wafford KA. *Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human alpha(4)beta(3)delta GABA(A) receptors.* Br J Pharmacol. 2002 Aug;136(7):965-74.
- Calza A, Sogliano C, Santoru F, Marra C, Angioni MM, Mostallino MC, Biggio G, Concas A. *Neonatal exposure to estradiol in rats influences neuroactive steroid concentrations, GABAA receptor expression, and behavioral sensitivity to anxiolytic drugs.* J Neurochem. 2010 Jun;113(5):1285-95.
- Carlson SL, O'Buckley TK, Thomas R, Thiele TE, Morrow AL. *Altered GABAA receptor expression and seizure threshold following acute ethanol challenge in mice lacking the RIIB subunit of PKA.* Neurochem Res. 2014 Jun;39(6):1079-87.
- Carver CM, Reddy DS. *Neurosteroid interactions with synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors: regulation of subunit plasticity, phasic and tonic inhibition, and neuronal network excitability.* Psychopharmacology (Berl). 2013 Nov;230(2):151-88.
- Carver CM, Wu X, Gangisetty O, Reddy DS. *Perimenstrual-like hormonal regulation of extrasynaptic delta-containing GABAA receptors mediating tonic inhibition and neurosteroid sensitivity.* J Neurosci. 2014 Oct 22;34(43):14181-97.

- Concas A, Mostallino MC, Perra C, Lener R, Roscetti G, Barbaccia ML, Purdy RH, Biggio G. *Functional correlation between allopregnanolone and [35S]-TBPS binding in the brain of rats exposed to isoniazid, pentylenetetrazol or stress.* Br J Pharmacol. 1996 Jun;118(4):839-46.
- Concas A, Mostallino MC, Porcu P, Follesa P, Barbaccia ML, Trabucchi M, Purdy RH, Grisenti P, Biggio G. *Role of brain allopregnanolone in the plasticity of gamma-aminobutyric acid type A receptor in rat brain during pregnancy and after delivery.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Oct 27;95(22):13284-9.
- Cooper EJ, Johnston GA, Edwards FA. *Effects of a naturally occurring neurosteroid on GABAA IPSCs during development in rat hippocampal or cerebellar slices.* J Physiol. 1999 Dec 1;521 Pt 2:437-49.
- Cope DW, Hughes SW, Crunelli V. *GABAA receptor-mediated tonic inhibition in thalamic neurons.* J Neurosci. 2005 Dec 14;25(50):11553-63.
- Corpéchet C, Collins BE, Carey MP, Tsouros A, Robel P, Fry JP. *Brain neurosteroids during the mouse oestrous cycle.* Brain Res. 1997 Aug 22;766(1-2):276-80.
- Critchlow V, Liebelt RA, Bar-Sela M, Mountcastle W, Lipscomb HS. *Sex difference in resting pituitary-adrenal function in the rat.* Am J Physiol. 1963 Nov;205(5):807-15.
- Darbra S, Mòdol L, Llidó A, Casas C, Vallée M, Pallarès M. *Neonatal allopregnanolone levels alteration: effects on behavior and role of the hippocampus.* Prog Neurobiol. 2014 Feb;113:95-105.
- Davis AM, Ward SC, Selmanoff M, Herbison AE, McCarthy MM. *Developmental sex differences in amino acid neurotransmitter levels in hypothalamic and limbic areas of rat brain.* Neuroscience. 1999;90(4):1471-82.
- Dazzi L, Motzo C, Imperato A, Serra M, Gessa GL, Biggio G. *Modulation of basal and stress-induced release of acetylcholine and dopamine in rat brain by abecarnil and imidazenil, two anxiolytic gamma-aminobutyric acidA receptor modulators.* J Pharmacol Exp Ther. 1995 Apr;273(1):241-7.
- Dazzi L, Serra M, Seu E, Cherchi G, Pisu MG, Purdy RH, Biggio G. *Progesterone enhances ethanol-induced modulation of mesocortical dopamine neurons: antagonism by finasteride.* J Neurochem. 2002 Dec;83(5):1103-9.
- Dazzi L, Seu E, Cherchi G, Barbieri PP, Matzeu A, Biggio G. *Estrous cycle-dependent changes in basal and ethanol-induced activity of cortical dopaminergic neurons in the rat.* Neuropsychopharmacology. 2007 Apr;32(4):892-901.

- De Coster S, van Larebeke N. *Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action*. J Environ Public Health. 2012;2012:713696.
- DeLorey TM, Olsen RW. *Gamma-aminobutyric acidA receptor structure and function*. J Biol Chem. 1992 Aug 25;267(24):16747-50.
- Diorio D, Viau V, Meaney MJ. *The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress*. J Neurosci. 1993 Sep;13(9):3839-47.
- Droogleever Fortuyn HA, van Broekhoven F, Span PN, Bäckström T, Zitman FG, Verkes RJ. *Effects of PhD examination stress on allopregnanolone and cortisol plasma levels and peripheral benzodiazepine receptor density*. Psychoneuroendocrinology. 2004 Nov;29(10):1341-4.
- Farrant M, Nusser Z. *Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors*. Nat Rev Neurosci. 2005 Mar;6(3):215-29.
- Finlay JM, Zigmond MJ, Abercrombie ED. *Increased dopamine and norepinephrine release in medial prefrontal cortex induced by acute and chronic stress: effects of diazepam*. Neuroscience. 1995 Feb;64(3):619-28.
- Finn DA, Phillips TJ, Okorn DM, Chester JA, Cunningham CL. *Rewarding effect of the neuroactive steroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one in mice*. Pharmacol Biochem Behav. 1997; 56(2): 261-4.
- Foecking EM, McDevitt MA, Acosta-Martínez M, Horton TH, Levine JE. *Neuroendocrine consequences of androgen excess in female rodents*. Horm Behav. 2008 May;53(5):673-92.
- Follesa P, Floris S, Tuligi G, Mostallino MC, Concas A, Biggio G. *Molecular and functional adaptation of the GABA(A) receptor complex during pregnancy and after delivery in the rat brain*. Eur J Neurosci. 1998 Sep;10(9):2905-12.
- Follesa P, Cagetti E, Mancuso L, Biggio F, Manca A, Maciocco E, Massa F, Desole MS, Carta M, Busonero F, Sanna E, Biggio G. *Increase in expression of the GABA(A) receptor alpha(4) subunit gene induced by withdrawal of, but not by long-term treatment with, benzodiazepine full or partial agonists*. Brain Res Mol Brain Res. 2001 Aug 15;92(1-2):138-48.
- Follesa P, Porcu P, Sogliano C, Cinus M, Biggio F, Mancuso L, Mostallino MC, Paoletti AM, Purdy RH, Biggio G, Concas A. *Changes in GABAA receptor gamma 2 subunit gene expression induced by long-term administration of oral contraceptives in rats*. Neuropharmacology. 2002 Mar;42(3):325-36.

- Fritschy JM, Panzanelli P. *GABAA receptors and plasticity of inhibitory neurotransmission in the central nervous system*. Eur J Neurosci. 2014 Jun;39(11):1845-65.
- Frye CA, Duncan JE. *Progesterone metabolites, effective at the GABAA receptor complex, attenuate pain sensitivity in rats*. Brain Res. 1994 Apr 18;643(1-2):194-203.
- Frye CA, Bayon LE, Pursnani NK, Purdy RH. *The neurosteroids, progesterone and 3 α ,5 α -THP, enhance sexual motivation, receptivity, and proceptivity in female rats*. Brain Res. 1998; 808(1): 72-83.
- Frye CA, Bo E, Calamandrei G, Calzà L, Dessì-Fulgheri F, Fernández M, Fusani L, Kah O, Kajta M, Le Page Y, Patisaul HB, Venerosi A, Wojtowicz AK, Panzica GC. *Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems*. J Neuroendocrinol. 2012 Jan;24(1):144-59.
- Girdler SS, Straneva PA, Light KC, Pedersen CA, Morrow AL. *Allopregnanolone levels and reactivity to mental stress in premenstrual dysphoric disorder*. Biol Psychiatry. 2001 May 1;49(9):788-97.
- Glykys J, Mody I. *The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus*. J Physiol. 2007 Aug 1;582(Pt 3):1163-78.
- Goebel-Goody SM, Davies KD, Alvestad Linger RM, Freund RK, Browning MD. *Phospho-regulation of synaptic and extrasynaptic N-methyl-d-aspartate receptors in adult hippocampal slices*. Neuroscience. 2009 Feb 18;158(4):1446-59.
- Goldman JM, Cooper RL, Rehnberg GL, Booth KC, McElroy WK, Hein JF. *Regional patterning of hormones in the female rat anterior pituitary: disproportionate changes over the estrous cycle*. Endocr Res. 1988-1989;14(4):263-82.
- Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. *The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies*. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2007 Apr;80(2):84-97.
- Gorski RA, Gordon JH, Shryne JE, Southam AM. *Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain*. Brain Res. 1978 Jun 16;148(2):333-46.
- Grazzini E, Guillon G, Mouillac B, Zingg HH. *Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone*. Nature. 1998 Apr 2;392(6675):509-12.

- Grobin AC, Morrow AL. *3Alpha-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one levels and GABA(A) receptor-mediated $^{36}\text{Cl}(-)$ flux across development in rat cerebral cortex*. Brain Res Dev Brain Res. 2001 Nov 26;131(1-2):31-9.
- Guennoun R, Labombarda F, Gonzalez Deniselle MC, Liere P, De Nicola AF, Schumacher M. *Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: response to injury and implication for neuroprotection*. J Steroid Biochem Mol Biol. 2015; 146: 48-61.
- Gulinello M, Smith SS. *Anxiogenic effects of neurosteroid exposure: sex differences and altered GABAA receptor pharmacology in adult rats*. J Pharmacol Exp Ther. 2003 May;305(2):541-8.
- Gunn BG, Cunningham L, Mitchell SG, Swinny JD, Lambert JJ, Belelli D. *GABAA receptor-acting neurosteroids: a role in the development and regulation of the stress response*. Front Neuroendocrinol. 2015 Jan;36:28-48.
- Handa RJ, Gorski RA. *Alterations in the onset of ovulatory failure and gonadotropin secretion following steroid administration to lightly androgenized female rats*. Biol Reprod. 1985 Mar;32(2):248-56.
- Herbison AE, Fénelon VS. *Estrogen regulation of GABAA receptor subunit mRNA expression in preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis of female rat brain*. J Neurosci. 1995 Mar;15(3 Pt 2):2328-37.
- Herman JP, Cullinan WE. *Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis*. Trends Neurosci. 1997 Feb;20(2):78-84.
- Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG. *Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites*. Nature. 2006 Nov 23;444(7118):486-9.
- Hu ZY, Bourreau E, Jung-Testas I, Robel P, Baulieu EE. *Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Dec;84(23):8215-9.
- Ikeda Y, Nagai A, Ikeda MA, Hayashi S. *Neonatal estrogen exposure inhibits steroidogenesis in the developing rat ovary*. Dev Dyn. 2001 Aug;221(4):443-53.
- Jacob TC, Moss SJ, Jurd R. *GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition*. Nat Rev Neurosci. 2008 May;9(5):331-43.
- Jacobson L, Sapolsky R. *The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis*. Endocr Rev. 1991 May;12(2):118-34.

- Johansson IM, Birzniece V, Lindblad C, Olsson T, Bäckström T. *Allopregnanolone inhibits learning in the Morris water maze*. Brain Res. 2002 May 3;934(2):125-31.
- Kanaya M, Yamanouchi K. *Defeminization of brain functions by a single injection of estrogen receptor α or β agonist in neonatal female rats*. Neuroendocrinology. 2012;95(4):297-304.
- Kant GJ, Lenox RH, Bunnell BN, Mougey EH, Pennington LL, Meyerhoff JL. *Comparison of stress response in male and female rats: pituitary cyclic AMP and plasma prolactin, growth hormone and corticosterone*. Psychoneuroendocrinology. 1983;8(4):421-8.
- Kashimada K, Koopman P. *Sry: the master switch in mammalian sex determination*. Development. 2010 Dec;137(23):3921-30.
- Kavaliers M, Wiebe JP. *Analgesic effects of the progesterone metabolite, 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one, and possible modes of action in mice*. Brain Res. 1987; 415(2): 393-8.
- Khisti RT, Chopde CT, Jain SP. *Antidepressant-like effect of the neurosteroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one in mice forced swim test*. Pharmacol Biochem Behav. 2000; 67(1): 137-43
- Kitay JJ. *Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat*. Endocrinology. 1961 May;68:818-24.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. *Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry*. Nature. 1991 May 9;351(6322):117-21.
- Korenbrot CC, Paup DC, Gorski RA. *Effects of testosterone propionate or dihydrotestosterone propionate on plasma FSH and LH levels in neonatal rats and on sexual differentiation of the brain*. Endocrinology. 1975 Sep;97(3):709-17.
- Kouki T, Kishitake M, Okamoto M, Oosuka I, Takebe M, Yamanouchi K. *Effects of neonatal treatment with phytoestrogens, genistein and daidzein, on sex difference in female rat brain function: estrous cycle and lordosis*. Horm Behav. 2003 Aug;44(2):140-5.
- Kuhl H, Weber W, Mehrlis W, Sandow J, Taubert HD. *Time- and dose-dependent alterations of basal and LH-RH-stimulated LH-release during treatment with various hormonal contraceptives*. Contraception. 1984 Nov;30(5):467-82.
- Kumar S, Porcu P, Werner DF, Matthews DB, Diaz-Granados JL, Helfand RS, Morrow AL. *The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of*

- ethanol: a decade of progress*. Psychopharmacology (Berl). 2009 Sep;205(4):529-64.
- Ladurelle N, Eychenne B, Denton D, Blair-West J, Schumacher M, Robel P, Baulieu E. *Prolonged intracerebroventricular infusion of neurosteroids affects cognitive performances in the mouse*. Brain Res. 2000 Mar 10;858(2):371-9.
 - Lambert JJ, Belelli D, Hill-Venning C, Peters JA. *Neurosteroids and GABAA receptor function*. Trends Pharmacol Sci. 1995 Sep;16(9):295-303.
 - Le Goascogne C, Robel P, Gouézou M, Sananès N, Baulieu EE, Waterman M. *Neurosteroids: cytochrome P-450_{scc} in rat brain*. Science. 1987 Sep 4;237(4819):1212-5.
 - Levine S, Mullins R. *Neonatal androgen or estrogen treatment and the adrenal cortical response to stress in adult rats*. Endocrinology. 1967 Jun;80(6):1177-9.
 - Liang J, Suryanarayanan A, Abriam A, Snyder B, Olsen RW, Spigelman I. *Mechanisms of reversible GABAA receptor plasticity after ethanol intoxication*. J Neurosci. 2007 Nov 7;27(45):12367-77.
 - Lovick TA, Griffiths JL, Dunn SM, Martin IL. *Changes in GABA(A) receptor subunit expression in the midbrain during the oestrous cycle in Wistar rats*. Neuroscience. 2005;131(2):397-405.
 - Lovick TA. *Plasticity of GABAA receptor subunit expression during the oestrous cycle of the rat: implications for premenstrual syndrome in women*. Exp Physiol. 2006 Jul;91(4):655-60.
 - Löw K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Rüdlicke T, Bluethmann H, Möhler H, Rudolph U. *Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety*. Science. 2000 Oct 6;290(5489):131-4.
 - Maguire JL, Stell BM, Rafizadeh M, Mody I. *Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety*. Nat Neurosci. 2005 Jun;8(6):797-804.
 - Maguire J, Mody I. *Neurosteroid synthesis-mediated regulation of GABA(A) receptors: relevance to the ovarian cycle and stress*. J Neurosci. 2007 Feb 28;27(9):2155-62.
 - Maguire J, Mody I. *GABA(A)R plasticity during pregnancy: relevance to postpartum depression*. Neuron. 2008 Jul 31;59(2):207-13.

- Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM. *Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor*. Science. 1986 May 23;232(4753):1004-7.
- McCarthy MM. *Estradiol and the developing brain*. Physiol Rev. 2008 Jan;88(1):91-124.
- McCarthy MM. *A piece in the puzzle of puberty*. Nat Neurosci. 2013 Mar;16(3):251-3.
- McCarthy MM, Nugent BM. *At the frontier of epigenetics of brain sex differences*. Front Behav Neurosci. 2015 Aug 21;9:221.
- McEwen BS, Lieberburg I, Chaptal C, Krey LC. *Aromatization: important for sexual differentiation of the neonatal rat brain*. Horm Behav. 1977 Dec;9(3):249-63.
- McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L, Marshall G, Macaulay A, Brown N, Howell O, Moore KW, Carling RW, Street LJ, Castro JL, Ragan CI, Dawson GR, Whiting PJ. *Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype*. Nat Neurosci. 2000 Jun;3(6):587-92.
- Meaney MJ, Stewart J, Poulin P, McEwen BS. *Sexual differentiation of social play in rat pups is mediated by the neonatal androgen-receptor system*. Neuroendocrinology. 1983 Aug;37(2):85-90.
- Mehta AK, Ticku MK. *An update on GABAA receptors*. Brain Res Brain Res Rev. 1999 Apr;29(2-3):196-217.
- Mellon S, Gong W, Griffin LD. *Niemann pick type C disease as a model for defects in neurosteroidogenesis*. Endocr Res. 2004 Nov;30(4):727-35.
- Mendelson WB, Martin JV, Perlis M, Wagner R, Majewska MD, Paul SM. *Sleep induction by an adrenal steroid in the rat*. Psychopharmacology (Berl). 1987;93(2):226-9.
- Mobbs CV, Flurkey K, Gee DM, Yamamoto K, Sinha YN, Finch CE. *Estradiol-induced adult anovulatory syndrome in female C57BL/6J mice: age-like neuroendocrine, but not ovarian, impairments*. Biol Reprod. 1984 Apr;30(3):556-63.
- Modol L, Casas C, Navarro X, Llidó A, Vallée M, Pallarès M, Darbra S. *Neonatal finasteride administration alters hippocampal $\alpha 4$ and δ GABAAR subunits*

- expression and behavioural responses to progesterone in adult rats.* Int J Neuropsychopharmacol. 2014 Feb;17(2):259-73.
- Mong JA, Roberts RC, Kelly JJ, McCarthy MM. *Gonadal steroids reduce the density of axospinous synapses in the developing rat arcuate nucleus: an electron microscopy analysis.* J Comp Neurol. 2001 Apr 2;432(2):259-67.
 - Monje L, Varayoud J, Muñoz-de-Toro M, Luque EH, Ramos JG. *Neonatal exposure to bisphenol A alters estrogen-dependent mechanisms governing sexual behavior in the adult female rat.* Reprod Toxicol. 2009 Dec;28(4):435-42.
 - Monnet FP, Mahé V, Robel P, Baulieu EE. *Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [3H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Apr 25;92(9):3774-8.
 - Morris JA, Jordan CL, Breedlove SM. *Sexual differentiation of the vertebrate nervous system.* Nat Neurosci. 2004 Oct;7(10):1034-9.
 - Morrow AL, Montpied P, Paul SM. *GABAA receptor function and expression following chronic ethanol and barbiturate administration.* Ann N Y Acad Sci. 1991;625:496-507.
 - Morrow AL, Porcu P. *Neuroactive steroids.* Encyclopedia of Psychopharmacology. Editors: Stolerman IP & Price LH, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 2014; pages 1-10, ISBN 978-3-642-27772-6.
 - Motzo C, Porceddu ML, Maira G, Flore G, Concas A, Dazzi L, Biggio G. *Inhibition of basal and stress-induced dopamine release in the cerebral cortex and nucleus accumbens of freely moving rats by the neurosteroid allopregnanolone.* J Psychopharmacol. 1996 Jan;10(4):266-72.
 - Nayeem N, Green TP, Martin IL, Barnard EA. *Quaternary structure of the native GABAA receptor determined by electron microscopic image analysis.* J Neurochem. 1994 Feb;62(2):815-8.
 - Nugent BM, Wright CL, Shetty AC, Hodes GE, Lenz KM, Mahurkar A, Russo SJ, Devine SE, McCarthy MM. *Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation.* Nat Neurosci. 2015 May;18(5):690-7.
 - Nuñez JL, Bambrick LL, Krueger BK, McCarthy MM. *Prolongation and enhancement of gamma-aminobutyric acid receptor mediated excitation by chronic treatment with estradiol in developing rat hippocampal neurons.* Eur J Neurosci. 2005 Jun;21(12):3251-61.
 - Nusser Z, Mody I. *Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells.* J Neurophysiol. 2002 May;87(5):2624-8.

- Olsen RW, Sieghart W. International Union of Pharmacology. LXX. *Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update.* Pharmacol Rev. 2008 Sep;60(3):243-60.
- Owens MJ, Ritchie JC, Nemeroff CB. *5 alpha-pregnane-3 alpha, 21-diol-20-one (THDOC) attenuates mild stress-induced increases in plasma corticosterone via a non-glucocorticoid mechanism: comparison with alprazolam.* Brain Res. 1992 Feb 28;573(2):353-5.
- Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Mura E, Quinn MJ Jr, Lavoie E, Palanza P, Ottinger MA. *Effects of xenoestrogens on the differentiation of behaviorally-relevant neural circuits.* Front Neuroendocrinol. 2007 Oct;28(4):179-200.
- Paoletti AM, Romagnino S, Contu R, Orrù MM, Marotto MF, Zedda P, Lello S, Biggio G, Concas A, Melis GB. *Observational study on the stability of the psychological status during normal pregnancy and increased blood levels of neuroactive steroids with GABA-A receptor agonist activity.* Psychoneuroendocrinology. 2006 May;31(4):485-92.
- Park-Chung M, Wu FS, Farb DH. *3 alpha-Hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons.* Mol Pharmacol. 1994 Jul;46(1):146-50.
- Patchev VK, Shoaib M, Holsboer F, Almeida OF. *The neurosteroid tetrahydroprogesterone counteracts corticotropin-releasing hormone-induced anxiety and alters the release and gene expression of corticotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus.* Neuroscience. 1994 Sep;62(1):265-71.
- Patchev VK, Hayashi S, Orikasa C, Almeida OF. *Implications of estrogen-dependent brain organization for gender differences in hypothalamo-pituitary-adrenal regulation.* FASEB J. 1995 Mar;9(5):419-23.
- Patchev VK, Hassan AH, Holsboer DF, Almeida OF. *The neurosteroid tetrahydroprogesterone attenuates the endocrine response to stress and exerts glucocorticoid-like effects on vasopressin gene transcription in the rat hypothalamus.* Neuropsychopharmacology. 1996 Dec;15(6):533-40.
- Paul SM, Purdy RH. *Neuroactive steroids.* FASEB J. 1992 Mar;6(6):2311-22.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 6th ed. Amsterdam; Boston: Elsevier, 2007; ISBN 9780080475134.
- Pearson Murphy BE, Steinberg SI, Hu FY, Allison CM. *Neuroactive ring A-reduced metabolites of progesterone in human plasma during pregnancy: elevated*

- levels of 5 alpha-dihydroprogesterone in depressed patients during the latter half of pregnancy.* J Clin Endocrinol Metab. 2001 Dec;86(12):5981-7.
- Peng Z, Hauer B, Mihalek RM, Homanics GE, Sieghart W, Olsen RW, Houser CR. *GABA(A) receptor changes in delta subunit-deficient mice: altered expression of alpha4 and gamma2 subunits in the forebrain.* J Comp Neurol. 2002 Apr 29;446(2):179-97.
 - Perrot-Sinal TS, Davis AM, Gregerson KA, Kao JP, McCarthy MM. *Estradiol enhances excitatory gamma-aminobutyric [corrected] acid-mediated calcium signaling in neonatal hypothalamic neurons.* Endocrinology. 2001 Jun;142(6):2238-43.
 - Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC. *Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig.* Endocrinology. 1959 Sep;65:369-82.
 - Pierson RC, Lyons AM, Greenfield LJ Jr. *Gonadal steroids regulate GABAA receptor subunit mRNA expression in NT2-N neurons.* Brain Res Mol Brain Res. 2005 Aug 18;138(2):105-15.
 - Pinilla L, Barreiro ML, Gonzalez LC, Tena-Sempere M, Aguilar E. *Comparative effects of testosterone propionate, oestradiol benzoate, ICI 182,780, tamoxifen and raloxifene on hypothalamic differentiation in the female rat.* J Endocrinol. 2002 Mar;172(3):441-8.
 - Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. *GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain.* Neuroscience. 2000;101(4):815-50.
 - Pisu MG, Dore R, Mostallino MC, Loi M, Pibiri F, Mameli R, Cadeddu R, Secci PP, Serra M. *Down-regulation of hippocampal BDNF and Arc associated with improvement in aversive spatial memory performance in socially isolated rats.* Behav Brain Res. 2011 Sep 12;222(1):73-80.
 - Porcu P, Mostallino MC, Sogliano C, Santoru F, Berretti R, Concas A. *Long-term administration with levonorgestrel decreases allopregnanolone levels and alters GABA(A) receptor subunit expression and anxiety-like behavior.* Pharmacol Biochem Behav. 2012 Aug;102(2):366-72.
 - Porcu P, Locci A, Santoru F, Berretti R, Morrow AL, Concas A. *Failure of acute ethanol administration to alter cerebrocortical and hippocampal allopregnanolone levels in C57BL/6J and DBA/2J mice.* Alcohol Clin Exp Res. 2014 Apr;38(4):948-58.

- Porcu P, Morrow AL. *Divergent neuroactive steroid responses to stress and ethanol in rat and mouse strains: relevance for human studies.* Psychopharmacology (Berl). 2014 Sep;231(17):3257-72.
- Purdy RH, Morrow AL, Blinn JR, Paul SM. *Synthesis, metabolism, and pharmacological activity of 3 alpha-hydroxy steroids which potentiate GABA-receptor-mediated chloride ion uptake in rat cerebral cortical synaptoneurosomes.* J Med Chem. 1990 Jun;33(6):1572-81.
- Purdy RH, Morrow AL, Moore PH Jr, Paul SM. *Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 May 15;88(10):4553-7.
- Rapkin AJ, Biggio G, Concas A. *Oral contraceptives and neuroactive steroids.* Pharmacol Biochem Behav. 2006 Aug;84(4):628-34.
- Reul JM, de Kloet ER. *Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation.* Endocrinology. 1985 Dec;117(6):2505-11.
- Rittmaster RS. *Finasteride.* N Engl J Med. 1994 Jan 13;330(2):120-5.
- Rodriguez P, Fernández-Galaz C, Tejero A. *Controlled neonatal exposure to estrogens: a suitable tool for reproductive aging studies in the female rat.* Biol Reprod. 1993 Aug;49(2):387-92.
- Rudolph U, Crestani F, Möhler H. *GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions.* Trends Pharmacol Sci. 2001 Apr;22(4):188-94.
- Rudolph U, Knoflach F. *Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes.* Nat Rev Drug Discov. 2011 Jul 29;10(9):685-97.
- Rudolph U, Möhler H. *GABAA receptor subtypes: Therapeutic potential in Down syndrome, affective disorders, schizophrenia, and autism.* Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2014;54:483-507.
- Rupprecht R. *Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties.* Psychoneuroendocrinology. 2003 Feb;28(2):139-68.
- Sabaliauskas N, Shen H, Molla J, Gong QH, Kuver A, Aoki C, Smith SS. *Neurosteroid effects at $\alpha 4\beta\delta$ GABAA receptors alter spatial learning and synaptic plasticity in CA1 hippocampus across the estrous cycle of the mouse.* Brain Res. 2015 Sep 24;1621:170-86.

- Sanna E, Mostallino MC, Murru L, Carta M, Talani G, Zucca S, Mura ML, Maciocco E, Biggio G. *Changes in expression and function of extrasynaptic GABAA receptors in the rat hippocampus during pregnancy and after delivery.* J Neurosci. 2009 Feb 11;29(6):1755-65.
- Sanna E, Talani G, Obili N, Mascia MP, Mostallino MC, Secci PP, Pisu MG, Biggio F, Utzeri C, Olla P, Biggio G, Follesa P. *Voluntary Ethanol Consumption Induced by Social Isolation Reverses the Increase of $\alpha(4)/\delta$ GABA(A) Receptor Gene Expression and Function in the Hippocampus of C57BL/6J Mice.* Front Neurosci. 2011 Feb 10;5:15.
- Santoru F, Berretti R, Locci A, Porcu P, Concas A. *Decreased allopregnanolone induced by hormonal contraceptives is associated with a reduction in social behavior and sexual motivation in female rats.* Psychopharmacology (Berl). 2014 Sep;231(17):3351-64.
- Sarkar J, Wakefield S, MacKenzie G, Moss SJ, Maguire J. *Neurosteroidogenesis is required for the physiological response to stress: role of neurosteroid-sensitive GABAA receptors.* J Neurosci. 2011 Dec 14;31(50):18198-210.
- Saxena NC, Macdonald RL. *Properties of putative cerebellar gamma-aminobutyric acid A receptor isoforms.* Mol Pharmacol. 1996 Mar;49(3):567-79.
- Schwarz JM, McCarthy MM. *Cellular mechanisms of estradiol-mediated masculinization of the brain.* J Steroid Biochem Mol Biol. 2008 Apr;109(3-5):300-6.
- Seeman TE, Singer B, Charpentier P. *Gender differences in patterns of HPA axis response to challenge: MacArthur studies of successful aging.* Psychoneuroendocrinology. 1995;20(7):711-25.
- Serra M, Sanna E, Mostallino MC, Biggio G. *Social isolation stress and neuroactive steroids.* Eur Neuropsychopharmacol. 2007 Jan;17(1):1-11.
- Shen H, Gong QH, Yuan M, Smith SS. *Short-term steroid treatment increases delta GABAA receptor subunit expression in rat CA1 hippocampus: pharmacological and behavioral effects.* Neuropharmacology. 2005 Oct;49(5):573-86.
- Shen H, Gong QH, Aoki C, Yuan M, Ruderman Y, Dattilo M, Williams K, Smith SS. *Reversal of neurosteroid effects at $\alpha 4\beta 2\delta$ GABAA receptors triggers anxiety at puberty.* Nat Neurosci. 2007 Apr;10(4):469-77.
- Shen H, Smith SS. *Plasticity of the $\alpha 4\beta \delta$ GABAA receptor.* Biochem Soc Trans. 2009 Dec;37(Pt 6):1378-84.

- Shen H, Sabaliauskas N, Sherpa A, Fenton AA, Stelzer A, Aoki C, Smith SS. *A critical role for $\alpha 4\beta 2$ GABAA receptors in shaping learning deficits at puberty in mice.* Science. 2010 Mar 19;327(5972):1515-8.
- Sigel E. *Mapping of the benzodiazepine recognition site on GABA(A) receptors.* Curr Top Med Chem. 2002 Aug;2(8):833-9.
- Sieghart W, Sperk G. *Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes.* Curr Top Med Chem. 2002 Aug;2(8):795-816.
- Sinnott RS, Mark GP, Finn DA. *Reinforcing effects of the neurosteroid allopregnanolone in rats.* Pharmacol Biochem Behav. 2002; 72(4): 923-9.
- Smith GB, Olsen RW. *Functional domains of GABAA receptors.* Trends Pharmacol Sci. 1995 May;16(5):162-8.
- Smith SS, Gong QH, Hsu FC, Markowitz RS, French-Mullen JM, Li X. *GABA(A) receptor $\alpha 4$ subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid.* Nature. 1998 Apr 30;392(6679):926-30.
- Smith SS, Gong QH, Li X, Moran MH, Bitran D, Frye CA, Hsu FC. *Withdrawal from 3α -OH- 5α -pregnan-20-One using a pseudopregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABAA-gated current and increases the GABAA receptor $\alpha 4$ subunit in association with increased anxiety.* J Neurosci. 1998 Jul 15;18(14):5275-84.
- Solum DT, Handa RJ. *Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus.* J Neurosci. 2002 Apr 1;22(7):2650-9.
- Thomas P, Mortensen M, Hosie AM, Smart TG. *Dynamic mobility of functional GABAA receptors at inhibitory synapses.* Nat Neurosci. 2005 Jul;8(7):889-97.
- Tretter V, Ehya N, Fuchs K, Sieghart W. *Stoichiometry and assembly of a recombinant GABAA receptor subtype.* J Neurosci. 1997 Apr 15;17(8):2728-37.
- Tretter V, Moss SJ. *GABA(A) Receptor Dynamics and Constructing GABAergic Synapses.* Front Mol Neurosci. 2008 May 30;1:7.
- Ukena K, Usui M, Kohchi C, Tsutsui K. *Cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the cerebellar Purkinje neuron and its neonatal change in rats.* Endocrinology. 1998 Jan;139(1):137-47.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP. *Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses.* Nat Rev Neurosci. 2009 Jun;10(6):397-409.

- Valera S, Ballivet M, Bertrand D. *Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Oct 15;89(20):9949-53.
- Vallée M, Rivera JD, Koob GF, Purdy RH, Fitzgerald RL. *Quantification of neurosteroids in rat plasma and brain following swim stress and allopregnanolone administration using negative chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry*. Anal Biochem. 2000 Dec 1;287(1):153-66.
- Van Cauter E, Leproult R, Kupfer DJ. *Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol*. J Clin Endocrinol Metab. 1996 Jul;81(7):2468-73.
- Wafford KA, Thompson SA, Thomas D, Sikela J, Wilcox AS, Whiting PJ. *Functional characterization of human gamma-aminobutyric acidA receptors containing the alpha 4 subunit*. Mol Pharmacol. 1996 Sep;50(3):670-8.
- Wallner M, Hancher HJ, Olsen RW. *Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Dec 9;100(25):15218-23.
- Weaver CE Jr, Marek P, Park-Chung M, Tam SW, Farb DH. *Neuroprotective activity of a new class of steroidal inhibitors of the N-methyl-D-aspartate receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Sep 16;94(19):10450-4.
- Wetzel CH, Hermann B, Behl C, Pestel E, Rammes G, Zieglgänsberger W, Holsboer F, Rupprecht R. *Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor*. Mol Endocrinol. 1998 Sep;12(9):1441-51.
- Whiting PJ. *The GABA-A receptor gene family: new targets for therapeutic intervention*. Neurochem Int. 1999 May;34(5):387-90.
- Wisden W, Herb A, Wieland H, Keinänen K, Lüddens H, Seeburg PH. *Cloning, pharmacological characteristics and expression pattern of the rat GABAA receptor alpha 4 subunit*. FEBS Lett. 1991 Sep 9;289(2):227-30.
- Wohlfarth KM, Bianchi MT, Macdonald RL. *Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABA(A) receptors containing the delta subunit*. J Neurosci. 2002 Mar 1;22(5):1541-9.
- Wójtowicz T, Lebida K, Mozrzymas JW. *17beta-estradiol affects GABAergic transmission in developing hippocampus*. Brain Res. 2008 Nov 19;1241:7-17.
- Wu FS, Gibbs TT, Farb DH. *Inverse modulation of gamma-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone*. Mol Pharmacol. 1990 May;37(5):597-602.

- Wu HQ, Turski WA, Ungerstedt U, Schwarcz R. *Systemic kainic acid administration in rats: effects on kynurenic acid production in vitro and in vivo*. Exp Neurol. 1991 Jul;113(1):47-52.
- Wu MV, Manoli DS, Fraser EJ, Coats JK, Tollkuhn J, Honda S, Harada N, Shah NM. *Estrogen masculinizes neural pathways and sex-specific behaviors*. Cell. 2009 Oct 2;139(1):61-72.
- Zinder O, Dar DE. *Neuroactive steroids: their mechanism of action and their function in the stress response*. Acta Physiol Scand. 1999 Nov;167(3):181-8.

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Neuroscienze dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2014/2015 - XXVIII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali".